

UNIVERSIDAD NACIONAL
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO
POSGRADO REGIONAL EN CIENCIAS VETERINARIAS TROPICALES



Presencia serológica de *Besnoitia besnoiti*, *Coxiella burnetii*, *Chlamydia abortus*, *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii* en hatos bovinos lecheros de la zona Huetar Norte de Costa Rica

Daisy Elena Fallas Elizondo

Universidad Nacional, Heredia, abril 2022

Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales, Maestría en Enfermedades Tropicales para optar por el grado de *Magister Scientiae*

Presencia serológica de *Besnoitia besnoiti*, *Coxiella burnetii*, *Chlamydia abortus*, *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii* en hatos bovinos lecheros de la zona Huetar Norte de Costa Rica

Daisy Elena Fallas Elizondo

Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales, Maestría en Enfermedades Tropicales para optar por el grado de *Magister Scientiae*

Miembros del Tribunal Examinador

[PhD. Mayela Coto Chotto/ Dra. Caterina Guzmán Verri/ Dr. Luis A. Miranda Calderón,
Dr. Francisco San Lee Campos, PhD. Álvaro Martín Parada Gómez, MSc. Daniel Rueda
Araya]

Representante del Consejo Central de Posgrado

[M.Sc. Sandra Estrada]
Coordinador del posgrado o su representante

[PhD. Gaby Dolz Wiedner]
Tutor de tesis

[PhD. Juan José Romero Zúñiga]
Miembro del Comité Asesor

[PhD. Ana Jiménez Rocha]
Miembro del Comité Asesor

[Daisy Elena Fallas Elizondo]
Sustentante

DEDICATORIA

Con todo mi ser dedico este trabajo a Dios, a mis padres y a mis hijos, quienes siempre con su amor y presencia son el motor que me ayuda a seguir adelante.

A mis compañeros y amigos de maestría: Mauricio, Luana y Martita. Han sido más que amigos mis hermanos, gracias a la vida por encontrarnos.

A mis estudiantes de la Universidad Técnica Nacional, que me han hecho amar la docencia y a ser un mejor ser humano.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Gaby Dolz Wiedner, mi profesora y tutora. Gracias por todo su apoyo, su guía, las oportunidades que me ha brindado siempre y su paciencia. Y gracias también doctora por enseñarme a trabajar con tanta excelencia y estar pendiente de los detalles.

Al Dr. Juan José Romero Zúñiga, por toda su guía con el trabajo, por su tiempo y sus enseñanzas.

Al Dr. Gereon Schares del Instituto Friedrich Loeffler de Greifswald – Insel Riems, Alemania, por todo su apoyo con materiales, su guía y colaboración con el estudio y mi persona.

A la Dra. Ana Jiménez por sus enseñanzas y su apoyo siempre que la he necesitado, le agradezco por ser mi profesora, guía y ejemplo a seguir.

Al Laboratorio de Medicina Poblacional y Zoonosis, en especial a Anthony y Sergio, por darme el espacio y tiempo para aprender tanto y crecer como una profesional que ama el trabajo de laboratorio, la investigación y la docencia.

A la Cooperativa Dos Pinos, sus médicos veterinarios y productores asociados de la zona Huetar Norte. Gracias por su colaboración con las muestras, por recibirme tan amablemente en las visitas y las entrevistas. Sin ustedes este trabajo no hubiera sido posible.

ÍNDICE GENERAL

| | Página |
|---------------------------------|--------|
| Dedicatoria..... | iv |
| Agradecimientos..... | v |
| Índice general..... | vi |
| Índice de cuadros..... | viii |
| Índice de figuras..... | ix |
| Resumen general..... | x |
| Introducción general..... | xii |
| Referencias bibliográficas..... | vi |

ARTÍCULO I

| | |
|---|----|
| Resumen..... | 1 |
| Abstract..... | 2 |
| 1. Introducción..... | 3 |
| 2. Metodología..... | 5 |
| 2.1 Tipo de estudio y población a estudiar..... | 5 |
| 2.2 Diagnóstico serológico..... | 6 |
| 2.3 Análisis de datos | 7 |
| 3. Resultados..... | 7 |
| 4. Discusión | 9 |
| 5. Conclusiones | 11 |
| 6. Recomendaciones | 11 |
| 7. Referencias bibliográficas | 12 |

| | Página |
|---|--------|
| ARTÍCULO II | |
| Resumen..... | 16 |
| Abstract..... | 17 |
| 1. Introducción..... | 18 |
| 2. Metodología..... | 20 |
| 2.1 Tipo y descripción del área de estudio..... | 20 |
| 2.2 Tipo, tamaño y toma de muestra | 20 |
| 2.3 Análisis serológico..... | 21 |
| 2.4 Análisis molecular..... | 22 |
| 2.5 Análisis de datos | 24 |
| 3. Resultados..... | 25 |
| 4. Discusión | 31 |
| 5. Conclusiones..... | 33 |
| 6. Recomendaciones | 34 |
| 7. Referencias bibliográficas | 35 |
| | |
| Discusión general | 43 |
| Referencias | 48 |
| Conclusiones generales | 51 |
| Recomendaciones generales | 52 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | Página |
|---|--------|
| ARTÍCULO I | |
| Cuadro 1. Seropositividad de <i>T. gondii</i> y <i>N. caninum</i> en bovinos de siete cantones de la zona Huetar Norte de Costa Rica..... | 8 |
| Cuadro 2. Seropositividad de <i>T. gondii</i> y <i>N. caninum</i> en fincas de siete cantones de la zona Huetar Norte de Costa Rica..... | 8 |
| Cuadro 3. Determinación de los Valores Predictivos Positivos y Valores Predictivos Negativos de las pruebas de ELISA comerciales utilizadas en el presente trabajo..... | 9 |
| ARTÍCULO II | |
| Cuadro 1. Seroprevalencia de <i>B. besnoiti</i> , <i>C. burnetii</i> y <i>C. abortus</i> en hatos bovinos lecheros y de doble propósito de diferentes distritos de la Región Huetar Norte de Costa Rica, 2018..... | 25 |
| Cuadro 2. Seroprevalencia de <i>B. besnoiti</i> , <i>C. burnetii</i> y <i>C. abortus</i> a nivel de hatos bovinos lecheros y de doble propósito en diferentes distritos de la Región Huetar Norte de Costa Rica, 2018..... | 26 |
| Cuadro 3. Análisis de correlación de las pruebas de serología para los sueros positivos para <i>B. besnoiti</i> y <i>C. burnetii</i> | 27 |
| Cuadro 4. Análisis de correlación de las pruebas de serología para los sueros positivos para <i>B. besnoiti</i> y <i>C. abortus</i> | 29 |
| Cuadro 5. Análisis de correlación de las pruebas de serología para los sueros positivos para <i>C. burnetii</i> y <i>C. abortus</i> | 29 |

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN GENERAL

| | |
|--|-------|
| Figura 1. Ciclo de vida y transmisión de <i>Besnoitia besnoiti</i> en bovinos (Álvarez-García <i>et al.</i> , 2011) | xiii |
| Figura 2. Ciclo de transmisión de <i>Coxiella burnetii</i> (Sykes & Norris, 2013)..... | xviii |
| Figura 3. El ciclo de las Chlamydiae en el ambiente (Collingro <i>et al.</i> , 2020)..... | xxii |
| Figura 4. Ciclo de transmisión de <i>Neospora caninum</i> (Dubey <i>et al.</i> , 2006)..... | xxvi |
| Figura 5. Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> (Dubey <i>et al.</i> , 2006)..... | xxix |

ARTÍCULO II

| | |
|---|----|
| Figura 1. Ubicación geográfica de las 40 fincas analizadas en la zona Huetar Norte de la Provincia de Alajuela, Costa Rica, 2018..... | 21 |
| Figura 2. Distribución de animales seropositivos a <i>Besnoitia besnoiti</i> según porcentaje S/P y distritos de la Región Huetar Norte de Costa Rica, 2018..... | 26 |
| Figura 3. Distribución de animales seropositivos a <i>Coxiella burnetii</i> según porcentaje S/P y distritos de la Región Huetar Norte de Costa Rica, 2018..... | 27 |
| Figura 4. Distribución de animales seropositivos a <i>Chlamydia abortus</i> según porcentaje S/P y distritos de la Región Huetar Norte de Costa Rica, 2018..... | 28 |
| Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR para <i>Besnoitia besnoiti</i> (1: Marcador molecular, 2: Control positivo 0,5ul ADN, 3, 4 y 5: Control positivo 5µl, 6: Control negativo, 8: Marcador molecular)..... | 30 |
| Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR anidado para <i>Coxiella burnetii</i> (1: Marcador molecular, 2 y 3: Control positivo, 4: Muestra de leche negativa, 5: Control positivo, 6: Control negativo, 7: Marcador molecular)..... | 30 |

RESUMEN GENERAL

En la primera parte del trabajo se investigaron tres protozoarios intracelulares obligados, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* y *Besnoitia besnoiti*, que han sido asociados con problemas reproductivos en bovinos, ocasionando pérdidas económicas en las fincas. El diagnóstico de estos apicomplexa se basa sobre todo en técnicas serológicas, ya que permiten detectar de forma rápida, tanto infecciones activas como infecciones crónicas. El objetivo del estudio fue determinar la presencia serológica de *T. gondii* y *N. caninum* en bovinos de la Región Huetar Norte de Costa Rica, establecer coexposiciones y determinar los valores predictivos de tres inmunoensayos indirectos (*T. gondii*, *N. caninum* y *B. besnoiti*) utilizando el Teorema de Bayes. . Se seleccionaron un total de 327 bovinos (164 seropositivos y 163 seronegativos para *B. besnoiti*) de un banco de sueros, recolectado en 40 fincas de leche y doble propósito de la Región Huetar Norte, los cuales se analizaron mediante inmunoensayos para *T. gondii* y *N. caninum*. Para *T. gondii* se determinaron prevalencias globales y a nivel de finca de 30,5% y 67,5%, para *N. caninum* de 18,0% y 75,0%, respectivamente. Además, se hallaron 42 (12,8%) animales con infecciones *T. gondii* y *B. besnoiti*, 39 (11,9%) bovinos con infecciones *N. caninum* y *B. besnoiti* y 11 (3,3%) animales con infecciones *T. gondii* y *N. caninum*. Siete animales (2,1%) presentaron infecciones con los tres agentes. Se determinó un valor predictivo positivo de 91,4%, 64,7%, 100,0% y un valor predictivo negativo de 98,5%, 100,0% y 99,0% para los ELISA de *T. gondii*, *N. caninum* y *B. besnoiti*, respectivamente. Se concluye, que las técnicas serológicas mostraron un buen desempeño, y que existen bajas posibilidades de resultados falsos positivos o negativos, con excepción del ensayo de *N. caninum*. Los resultados confirman además la circulación de *T. gondii*, *N. caninum* y *B. besnoiti* en los hatos bovinos de la Región Huetar Norte. Se recomienda alertar a productores y médicos veterinarios sobre la presencia de estos parásitos, así como sobre la posibilidad de infecciones concomitantes de dos y hasta tres apicomplexa en fincas de la zona Huetar Norte. Se recomienda implementar programas de educación y control para reducir la toxoplasmosis, una enfermedad zoonótica y desatendida, de los hatos bovinos de Costa Rica.

En la segunda parte del trabajo se analizaron los agentes infecciosos *Besnoitia besnoiti*, *Coxiella burnetii* y *Chlamydia abortus* ocasionan enfermedad reproductiva en bovinos, mientras que los últimos dos se consideran además agentes zoonóticos. Hasta la fecha no se cuentan con reportes de prevalencia de *B. besnoiti* y *C. burnetii* en bovinos de Costa Rica. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la seroprevalencia y distribución de *B. besnoiti*, *C. burnetii* y *C. abortus* en fincas en la zona Huetar Norte de Costa Rica, así como detectar estos agentes mediante técnicas moleculares. Se realizó un estudio transversal descriptivo, en el que se analizaron 600 sueros de 40 fincas de bovinos de leche y doble propósito (15 sueros por finca). Las fincas seleccionadas se localizaron en los distritos de Aguas Zarcas (5), Ciudad Quesada (9), Fortuna (4), Monterrey (2), Muelle (3), Venecia (5) y Zarcero (12). El análisis serológico se realizó utilizando los ensayos de la compañía IDVET (Montpellier, Francia): IDScreen® *Besnoitia* Indirect 2.0 ELISA, IDScreen® Q Fever Indirect ELISA, e ID Screen® *Chlamydomphila abortus* Indirect Multi-species ELISA. Además, se analizaron mediante técnicas moleculares 3 quistes cutáneos para *B. besnoiti*, 6 muestras de leche para *C. burnetii* y 4 hisopados vaginales para *C. abortus*. Las seroprevalencias determinadas para *B. besnoiti*, *C. burnetii* y *C. abortus* fueron 27,3%, 16,8% y 1,3%, respectivamente. Animales seropositivos a besnoitiosis se encontraron en todos los distritos analizados, menos en la Fortuna, pero sobre todo en Aguas Zarcas (64%), Venecia (36,6%) y Zarcero (33,3%). Los animales seropositivos a coxelirosis se encontraron también distribuidos en todos los distritos, sobre todo en Zarcero (24,6%), Ciudad Quesada (19,2%) y Aguas Zarcas (17,7%). Con respecto a *C. abortus*, se encontraron pocos animales seropositivos en tres distritos: Aguas Zarcas (3,3%), Monterrey (3,3%) y Ciudad Quesada (2,9%). Solamente se detectó coexposiciones de *B. besnoiti* con *C. burnetii* en un total del 6,5% (n= 36) de animales infectados y en un 30,0% (n= 12) de fincas, que se ubicaron en Zarcero (n=10), Aguas Zarcas (n=1) y Ciudad Quesada (n= 1). Todos los análisis moleculares resultaron negativos. Se determinó por primera vez la presencia de anticuerpos contra *B. besnoiti* y *C. burnetii* en bovinos de la región Huetar Norte de nuestro país. Se recomienda alertar a los productores, personal veterinario y a las autoridades oficiales sobre estos hallazgos, para tomar las medidas de prevención y control necesarias, en particular para *C. burnetii* por su potencial zoonótico. Se recomienda además realizar investigaciones para

confirmar mediante aislamiento o diagnóstico molecular, la presencia de los agentes infecciosos en el país.

Palabras claves

inmunoensayo enzimático, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, coexposiciones, reacción en cadena de la polimerasa.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Besnoitiosis

La besnoitiosis es una enfermedad que afecta a los bovinos y es causada por los quistes generados por el protozooario intracelular obligado *Besnoitia besnoiti* del phylum Apicomplexa, familia Sarcocystidae, subfamilia Toxoplasmatinae, y género *Besnoitia*, el cual consta de 10 especies, de las cuales *Besnoitia besnoiti*, *Besnoitia tarandi*, *Besnoitia caprae* y *Besnoitia bennetti* ocasionan enfermedad de leve a severa en ungulados (bovinos, rumiantes silvestres, cabras y equinos) (Álvarez-García *et al.*, 2014). El protozooario se ubica en diferentes órganos, lo cual da como resultado abortos, baja ganancia de peso, compresión testicular, mastitis y problemas cutáneos. Tiene una progresión lenta y afecta a los animales de forma crónica una vez establecida la infección (Cortes *et al.*, 2014).

El mayor impacto que causa este parásito son las pérdidas económicas debido a los efectos causados por formación de quistes en piel, glándula mamaria, escroto y órganos internos en los animales infectados (Schaes *et al.*, 2009).

La distribución de la enfermedad es mundial (Álvarez-García *et al.*, 2013a). En Europa se considera una enfermedad emergente (Alemania, España y Francia), por lo que en los últimos 10 años se han intensificado las investigaciones mediante técnicas serológicas y moleculares, así como aislamiento del agente mediante cultivo celular (Cortes *et al.*, 2007; Jacquet *et al.*, 2010; Nasir *et al.*, 2012; García-Lunar *et al.*, 2013). La besnoitiosis fue reportada en América por primera vez en Venezuela mediante diagnóstico histopatológico (Vogelsang & Gallo, 1941) y mediante técnicas indirectas (serología, inmunofluorescencia y western blot) en Brasil (Uzeda *et al.*, 2014).

Se desconoce el ciclo del parásito como también el hospedador definitivo, quien es el que aloja los esquizontes y gamontes, y además libera los ooquistes después de la ingestión de tejidos infectados. En los bovinos se han encontrado los taquizoitos y los bradizoitos en quistes, por lo que se consideran hospedadores intermediarios (Schaes *et al.*, 2009; Álvarez-García *et al.*, 2013a). Para algunas especies de *Besnoitia* (*Besnoitia darlingi*, *Besnoitia wallacei*, *Besnoitia oryctofelis* y *Besnoitia neotomofelis*) se ha determinado al gato como hospedador definitivo, mientras que para las demás especies (*B. besnoiti*, *Besnoitia bennetti*,

Besnoitia jellisoni, *Besnoitia caprae*, *Besnoitia tarandi* y *Besnoitia akodoni*) se desconoce aún el hospedador definitivo (Álvarez-García *et al.*, 2014).

El protozoo se transmite de forma mecánica, mediante insectos chupadores de sangre de las familias Tabanidae y Muscidae, y iatrogénico mediante agujas hipodérmicas (Jacquet *et al.*, 2010). La transmisión por contacto directo durante la monta natural parece ser posible (EFSA, 2010; Álvarez-García *et al.*, 2013a (Figura 1). El ganado infectado es el reservorio del parásito para los vectores (insectos chupadores de sangre) (Álvarez-García *et al.*, 2014).

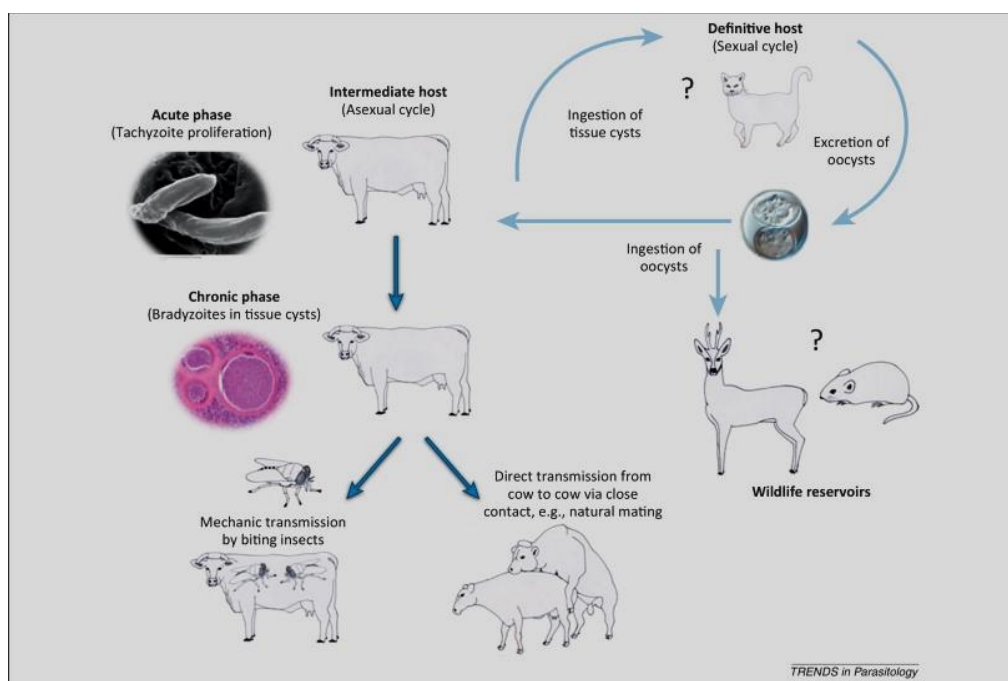


Figura 1. Ciclo de vida y transmisión de *Besnoitia besnoiti* en bovinos (Álvarez-García *et al.*, 2011).

Una vez infectados los bovinos con *B. besnoiti*, la besnoitiosis progresa en dos fases (con periodo de incubación de 1 a 13 días): la fase aguda febril, también llamada la fase de anasarca. Esta fase es causada por los tachizoítos que se replican rápidamente en las células endoteliales en túnica media y adventicia de las células endoteliales, y en células mononucleares. Se caracteriza inicialmente por fiebre y luego por edema que puede durar de 4 a 5 semanas. A esta le sigue la fase crónica o de escleroderma, en la cual se desarrollan los quistes patognomónicos de la enfermedad, los cuales causan las lesiones de piel (Álvarez-García *et al.*, 2014). Subsecuentemente, los animales afectados permanecen infectados

crónicamente. Los edemas y quistes pueden presentarse simultáneamente desde los 11 días hasta las 5 semanas post infección (Basson *et al.*, 1970). En los bovinos ocurre una multiplicación rápida de los taquizoítos y una lenta multiplicación de los bradizoítos en quistes en los tejidos, lo cual ocasiona la fase aguda y la crónica, respectivamente (Álvarez-García *et al.*, 2014).

Los taquizoítos se encuentran presentes en sangre solamente durante la reacción febril, mientras que los bradizoítos son liberados de los quistes y pueden ser transmitidos a animales sanos (Álvarez-García *et al.*, 2014). Durante la fase febril aguda, los taquizoítos, como parásitos intracelulares obligados, comienzan a invadir las células endoteliales de los vasos sanguíneos, causando lesiones vasculares necróticas y degenerativas, vasculitis y trombosis, que posteriormente causan congestión, hemorragias e infartos (Álvarez-García *et al.*, 2014).

Los taquizoítos liberados de las células endoteliales y de las células mononucleares parasitadas son diseminados por la circulación sanguínea, para parasitar nuevas células y repetir el ciclo lítico. Los taquizoítos pueden ser detectados en la sangre desde el tercer hasta el 12º día del inicio de la reacción febril, ocasionando permeabilidad vascular y edema, que aparece inicialmente en las áreas de cabeza y cuello, pudiendo avanzar hacia las extremidades y partes ventrales del cuerpo, como la mama y el escroto, donde se hace más visible (Álvarez-García *et al.*, 2014).

La segunda fase de la enfermedad, también llamada la fase de esclerodermia se produce por la replicación lenta de los bradizoítos dentro de los quistes tisulares con tropismo para los tejidos conectivos, principalmente en las membranas mucosas, las capas superficiales de la piel y el tracto genital masculino (Álvarez-García *et al.*, 2014). Los quistes multifocales de tejido fino en la conjuntiva escleral son patognomónicos y, junto con los localizados en la región vulvar y en la mucosa nasal, pueden ser detectados en el examen clínico tan pronto como 8 semanas post-infección. Los quistes maduros son de forma esférica a subsférica y miden hasta 390 µm de diámetro, conteniendo aproximadamente 200.000 bradizoítos (Álvarez-García *et al.*, 2014).

En la etapa aguda se dan síntomas como fiebre de entre 2 y 10 días, debido a un aumento en el número de taquizoítos en macrófagos, fibroblastos y células endoteliales de los vasos sanguíneos (Jacquie *et al.* 2010; Esteban-Gil *et al.*, 2014). La fiebre puede ir de

40.8°C a 41.6°C, lo cual puede ocasionar abortos (Álvarez-García *et al.*, 2014). También ocurre fotofobia, descargas óculo-nasales, anorexia, aumento de la frecuencia cardiaca y respiratoria, detención de la rumia y orquitis (Jacquiet *et al.*, 2010). Se pueden encontrar hemorragias, necrosis, pseudo-membranas, edemas y erosiones en el tracto respiratorio superior (Álvarez-García *et al.*, 2014).

La fase crónica incluye agrandamiento de los linfonodos, se pueden observar engrosadas las ubres y los testículos, puede haber resistencia al movimiento y dolor en la piel que se muestra engrosada y con hiperqueratosis. Los quistes se desarrollan en múltiples tejidos (piel, conjuntiva esclerótica, músculos, mucosa de la vulva, hígado, bazo, corazón, testículos, epidídimo, ampolla deferente y plexo pampiniforme), los cuales contienen bradizoítos. En esta etapa se da la “elefantiasis” (piel engrosada como de elefante) y caquexia (Jacquiet *et al.*, 2010).

El diagnóstico de la enfermedad se basa en la aparición de los signos clínicos y la confirmación mediante técnicas de laboratorio, entre las cuales se encuentran: aislamiento en cultivo celular, técnicas moleculares y métodos indirectos como inmunoensayo enzimático (ELISA), inmunofluorescencia indirecta (IFAT) y Western Blot (WB). Las pruebas indirectas permiten detectar tanto a los animales crónicamente infectados, así como a los subclínicos (Goldman and Pipano, 1983; Janitschke *et al.*, 1984; García-Lunar *et al.*, 2013). Para los estudios epidemiológicos, se desarrollaron exámenes de ELISA (Cortés *et al.*, 2006), IFAT (Schares *et al.*, 2010) y también de WB (Fernández-García *et al.*, 2009).

El diagnóstico histopatológico de besnoitosis se realiza utilizando biopsias cutáneas de bovinos que padecen de la enfermedad crónica (Cortés *et al.*, 2014). Sin embargo, para el diagnóstico de animales infectados subclínicamente, la histopatología no es posible por la falta de quistes, por lo que se busca el agente en muestras de sangre, utilizando técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Cortés *et al.*, 2007a). Las técnicas de PCR convencional y en tiempo real implementadas amplifican un segmento del gen ITS1 del ADN del parásito (Cortés *et al.*, 2007a), mostrando una alta sensibilidad y especificidad (Cortés *et al.*, 2007a).

Con respecto al tratamiento, en 1985 Shkap y colaboradores probaron la oxitetraciclina en conejos experimentalmente infectados y lo reportaron como un potencial terapéutico. Otro medicamento que ha sido probado es la nitazoxanida, la cual demostró un efecto inhibitorio

en la invasión celular provocada por los taquizoítos que se encuentran extracelularmente (Cortes *et al.*, 2007b). A la fecha no existe ninguna vacuna que logre inmunizar efectivamente a los animales (Álvarez-García *et al.*, 2013a).

2. Coxielosis

La coxielosis es una enfermedad en bovinos causada por *Coxiella burnetii*, un bacilo gram negativo, de 0.3 a 0.5 micras de diámetro, acidófilo e intracelular obligado, de distribución mundial (Jaton *et al.*, 2013; Bielawska-Drózd *et al.*, 2014).

Este agente, similar a las rickettsias, ocasiona problemas reproductivos, incluyendo abortos. Los animales infectados transmiten la bacteria a través de fómites, leche y placenta, tanto a otros animales como al ser humano, siendo muy resistente en el medio ambiente. Esta zoonosis conocida como “Fiebre Q” se considera de importancia debido a la facilidad en su transmisión y a los síntomas tan graves que ocasiona (Eldin *et al.*, 2017).

Coxiella burnetii se encuentra distribuida en todo el mundo, se ha detectado en diferentes especies de animales, pero su principal reservorio son los rumiantes domésticos (Vanderburg *et al.*, 2014), reportándose brotes en Francia, Suiza, Gran Bretaña y Canadá (Mege *et al.*, 1997).

El agente es una Gammaproteobacteria, orden Legionellales y familia *Coxiellaceae*, única especie del género *Coxiella* (Duron *et al.* 2014). Aunque el estilo de vida y las estrategias parasitarias de *C. burnetii* se parecen a las bacterias de familias como *Rickettsiaceae* y *Chlamydiaceae*, su genoma difiere considerablemente en términos de presencia de elementos móviles, grado de reducción del genoma, capacidades metabólicas y perfiles de transportador (Seshadri *et al.*, 2003). Se reportan diversas cepas de *C. burnetii*: Q212, DOG_UTAD, Cb109, RSA_493_16S, Z3055, Cb196_SAUDI_A, Dugway, Cb175_Cayenne_FrenchGuyana, Q154, RSA331, Cb185 (Eldin *et al.*, 2017).

La transmisión entre animales ocurre mediante garrapatas duras (*Rhipicephalus*, *Ixodes*, *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*) y suaves (*Ornithodoros*, *Argas*) (Duron *et al.*, 2015). Ambos tipos de garrapatas se infectan durante la alimentación, la bacteria se transmite tanto transestadial como transováricamente (vector biológico). La bacteria es excretada además a través de las heces, la saliva y el líquido coxal de las garrapatas (vector mecánico en los bovinos). Las garrapatas no son consideradas un

vector importante para la transmisión del agente a las personas, sin embargo, se debe tener cuidado al manipularlas (Mediannikov *et al.*, 2010). La transmisión se da además a través de la manipulación de placentas y fluidos uterinos (durante el parto y abortos), y a través de la leche. Los animales también excretan el microorganismo en la fase aguda en orina, heces, secreciones genitales, leche y exudados nasales, los cuales son inhalados por otros animales (Kılıç *et al.*, 2016).

Se ha determinado que el microorganismo puede permanecer viable hasta 150 días en el ambiente, debido a que posee una morfología muy similar a esporas bajo condiciones ambientales, lo cual lo hace extremadamente resistente al calor, la presión, la desecación y otros compuestos antisépticos (Berri *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2013).

Después del aborto los animales pueden secretar la bacteria en la leche hasta por 32 meses. Durante el parto o el aborto, la concentración del patógeno aumenta en todas las secreciones, placenta y otros fluidos producidos durante esta etapa, convirtiéndose en la principal vía de contagio de la enfermedad tanto para animales como para el ser humano (Kılıç *et al.*, 2016).

Las ovejas, el ganado y las cabras son los reservorios más comunes, sin embargo, los perros y gatos también pueden transmitir la infección al ser humano. Las garrapatas transmiten la bacteria a las especies de vida silvestre, especialmente a los roedores (ratones), los conejos y a las aves. Los perros, los gatos y los humanos también pueden infectarse cuando entran en contacto (o ingieren) especies de vida silvestre o ingieren leche o productos lácteos infectados (Sykes & Norris, 2013). Otras formas de transmisión incluyen la exposición de personal de laboratorio al agente, transfusiones sanguíneas, contacto sexual y bioterrorismo (Madariaga *et al.*, 2003) (Figura 2).

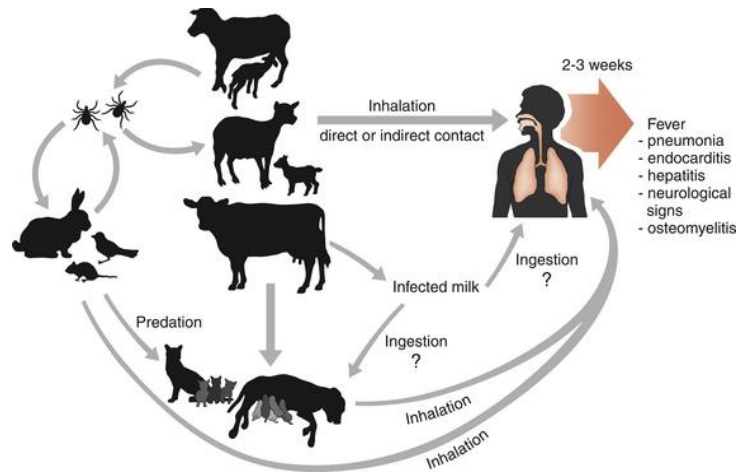


Figura 2. Ciclo de transmisión de *Coxiella burnetii* (Sykes & Norris, 2013).

Después de la inhalación de *C. burnetii*, el agente penetra los macrófagos alveolares mediante fagocitosis dependiente de actina. Luego de 8 a 48 horas post-infección, se forma una “vacuola que contiene *Coxiella*” (VCC), la cual se va agrandando conforme la bacteria se multiplica formando sus propias vacuolas dentro de la estructura, hasta ocupar casi todo el volumen de la célula huésped (Roman *et al.*, 1991).

A los 6 días post-infección, las vacuolas de *Coxiella* se dividen a su vez en vacuolas más pequeñas. A esto se le llama capacidad fusogénica, que se basa en la síntesis de proteínas de *C. burnetii* con el fin de favorecer su multiplicación dentro del huésped. A pesar de esto, la viabilidad de la célula huésped no se ve afectada por la expansión drástica de la vacuola, la cual ocupa gran parte del citoplasma y con un volumen mucho mayor de la inicial. El genoma de la célula huésped permanecen sin cambios, *C. burnetii* prolonga la viabilidad de la célula huésped de dos maneras: inhibe activamente las vías de señalización apoptóticas e induce factores pro-supervivencia (Shaik *et al.*, 2013).

Durante la infección aguda, la dosis infectiva puede ser tan baja como 1-10 células de *C. burnetii*, lo que sugiere que hay otros mecanismos que promueven la propagación de la bacteria para infectar otras células susceptibles. *C. burnetii* también es capaz de inducir la apoptosis mediante la liberación de Citocromo C por parte de las mitocondrias, en un mecanismo que depende de la síntesis de proteínas bacterianas. La prevención de la apoptosis parece ser utilizada por *C. burnetii* para causar infecciones persistentes, mientras que la inducción de la apoptosis parece favorecer la propagación de la bacteria a células susceptibles cercanas (Shaik *et al.*, 2013).

En las personas, la mitad de los infectados pueden permanecer asintomáticos. Sin embargo, se describen formas sintomáticas de carácter agudo con signos clínicos inespecíficos: fiebre alta, dolor de cabeza severo (retro-orbital), mialgia, malestar general, neumonía y hepatitis, que por lo general dura 1-2 semanas. En el 1-2% de los casos, la Fiebre Q aguda se convierte en una infección crónica que se manifiesta con endocarditis, hepatitis, vasculitis bacteriana o como un síndrome de fatiga y puede tener evolución fatal en ausencia de tratamiento. La sospecha y orientación clínica correcta, así como el diagnóstico microbiológico constituyen un reto para el manejo adecuado de estos pacientes (Frangoulidis *et al.*, 2006; Fariñas & Collado, 2010; Kılıç *et al.*, 2016; Shaik *et al.*, 2013).

Los signos clínicos de la infección aguda se desconocen en animales, mientras que la infección crónica causa abortos, infertilidad, metritis, placentitis, nacimientos prematuros, natimortos, y crías débiles en ganado bovino, ovino y caprino. Los abortos suelen ser tardíos, hacia el final de la gestación y suele existir retención placentaria. A veces se presenta con cuadros de neumonía, conjuntivitis, infecciones urogenitales y artritis, pero suele ser raro (Shaik *et al.*, 2013).

En humanos, el diagnóstico se realiza indirectamente mediante serología. *C. burnetti* no crece en medios bacteriológicos comunes y su aislamiento es largo, difícil y peligroso de realizar, dado que requiere condiciones de bioseguridad de nivel 3. Rara vez se realiza el diagnóstico de rutina mediante aislamiento y esto se restringe a laboratorios especializados que utilizan la técnica de cultivo celular (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005; Agerholm, 2013).

Para el diagnóstico directo, se realiza PCR. Se han desarrollado varios protocolos específicos que amplifican segmentos de los siguientes genes: super óxido dismutasa, 16S ARN, el elemento repetitivo htpAB y htpA (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005). El diagnóstico en los animales se basa en técnicas indirectas (serología), debido a que no presentan signos específicos en la infección aguda, que posteriormente se puede confirmar mediante PCR (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005).

Con respecto a las técnicas serológicas, las pruebas ELISA permiten analizar un mayor número de animales, muestran buena sensibilidad, además se considera una herramienta útil para análisis seroepidemiológico, debido a su bajo costo. La técnica de IFAT es otra prueba que también se ha utilizado en el diagnóstico indirecto (Slaba *et al.*, 2005).

La mayoría de los animales que excretan *C. burnetii* en el moco vaginal, las heces o la leche son seropositivos, sin embargo, se han reportado animales que excretan la bacteria y permanecen seronegativos, dificultando la identificación de todos los animales infectados (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005; Berri *et al.*, 2001). En estos casos se recomienda el diagnóstico mediante PCR, analizando placentas o abortos, fluidos vaginales, leche, sangre entera, hígado o pulmón. La combinación de ELISA (monitoreo) y PCR (confirmación), es hasta la fecha la mejor forma de diagnosticar la coxielosis en rumiantes (Agerholm, 2013; Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005). Mediante PCR (punto final y tiempo real) se pueden analizar tanto muestras clínicas (tejidos de animales después del examen post-mortem, productos de nacimiento, hisopos, heces, suero sanguíneo, leche), como alimentos procesados de origen animal (queso, yogur, leche pasteurizada), pero también muestras ambientales como suelo, polvo, y muestras de aire (Van den Brom, 2015).

El cultivo celular es la prueba de oro para el diagnóstico de *C. burnetii*, ya que confirma la presencia y se determina además la viabilidad de la bacteria en una muestra. Las bacterias se crecen en células Vero con medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 3%, o DMEM con suero fetal bovino al 10%, y midiendo su propagación en el cultivo celular mediante el uso de PCR en tiempo real (Larson *et al.*, 2017; Stewart *et al.*, 2015).

Las medidas terapéuticas y preventivas en los rumiantes tienen el fin de disminuir las tasas de aborto y la diseminación bacteriana, y por lo tanto también a reducir la contaminación ambiental. Se deben tomar medidas preventivas cuando se introduce un animal nuevo a una finca libre de la enfermedad, para evitar la introducción de la bacteria (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005).

Es difícil determinar la susceptibilidad de *C. burnetii* a los antibióticos, así como encontrar un fármaco eficaz para el tratamiento de la enfermedad. Esto ocurre debido a que es un organismo intracelular obligado y a la naturaleza ácida del ambiente intracelular en el que reside el patógeno (especialmente en las manifestaciones crónicas de la infección) (Brennan & Samuel, 2003; Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005). Se han realizado varios estudios para evaluar la eficacia de una amplia gama de antibióticos contra *C. burnetii*. Los tratamientos recomendados para las infecciones por *C. burnetii* incluyen doxiciclina durante 2 semanas para infecciones agudas y doxiciclina más cloroquina durante al menos 18 meses

para infecciones crónicas (Brennan & Samuel, 2003). El hecho de que existen animales asintomáticos que pueden portar y secretar la bacteria, así como debido a la facilidad con la que las personas pueden adquirir la infección se recomienda realizar el examen serológico a los hatos, y en caso de ocurrir abortos, enviar muestras para análisis molecular. En caso de encontrarse la bacteria en el hato, es importante evitar el consumo de leche sin pasteurizar (esto aplica para los terneros y las personas), además de implementar medidas de limpieza y desinfección en los corrales en los cuales permanecen los animales en lactación (Guatteo *et al.*, 2006). El uso de una vacuna para los bovinos se ha descrito en Francia, la cual reporta protección de un 80% de los animales en hatos seropositivos (Taurel *et al.*, 2014).

3. Clamidiosis

La clamidiosis es una infección causada por *Chlamydia abortus*, una bacteria gram negativa e intracelular obligada, *C. abortus* ha sido asociada a con abortos y signos similares a la gripe en humanos, y como causa del aborto enzootico e infertilidad en rumiantes (bovinos, ovinos) (DeGraves *et al.*, 2004; Salazar *et al.*, 2015; Sachse *et al.* 2015). La bacteria pertenece al phylum *Chlamydiae*, orden *Chlamydiales*, familia *Chlamydiaceae* y género *Chlamydia*. Fue descrito por primera vez por Page en 1966 (Page, 1966; Sachse *et al.* 2015). En regiones endémicas se reportan hasta un 5-10% de abortos en hembras gestantes, mientras que en brotes pueden presentarse abortos o nacimientos prematuros en hasta un 30% de hembras preñadas (Aitken *et al.*, 1993).

La presencia del agente ha sido detectada mediante ELISA, PCR y cultivo celular en África, América, Asia y Europa (Wang *et al.*, 2001; Jiménez-Estrada *et al.* 2008; Sting *et al.*, 2006; Wheelhouse *et al.* 2010; Pospischil *et al.*, 2012). En Costa Rica se reportó su presencia mediante técnicas serológicas en bovinos de leche y doble propósito, así como en ovinos (Fonseca *et al.*, 2014; Villagra-Blanco *et al.*, 2015; Fallas *et al.*, 2018).

La bacteria se alterna en su ciclo de vida entre una forma extracelular infecciosa y metabólicamente inactiva llamada cuerpo elemental, y una forma intracelular no infecciosa pero metabólicamente activa llamada cuerpo reticular, como formas intermedias (Longbottom & Coulter, 2003; Fonseca *et al.*, 2015).

La transmisión del agente ocurre por contacto directo con los cuerpos elementales en las excretas (descargas uterinas, oculares, vaginales, orina, semen, productos del parto o

abortos), o transmisión venérea por monta natural o inseminación artificial, como también por inhalación del agente en ambientes contaminados (Reinhold *et al*, 2011; Fonseca *et al*, 2015).

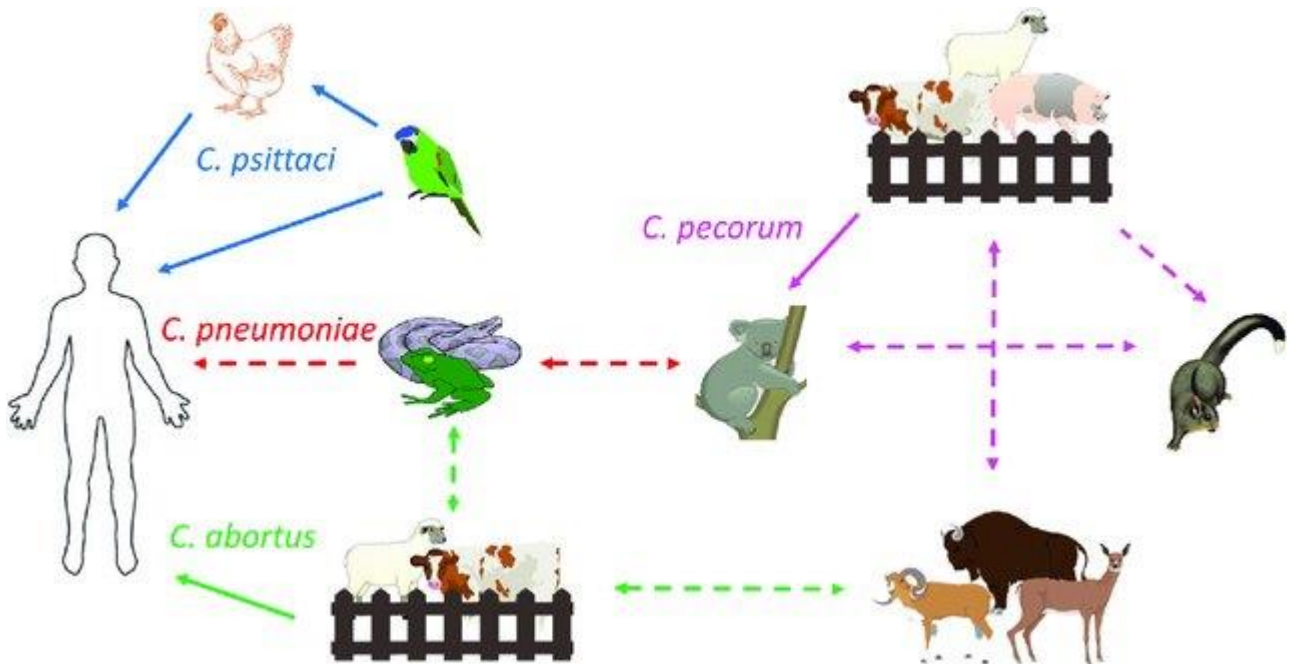


Figura 3. El ciclo de transmisión de la clamidiosis entre especies (Burnard & Polkinghorne, 2016).

Una vez que los cuerpos elementales ingresan en el organismo a través de alimento o fomites contaminados con material de abortos o placentas, por la vía digestiva o aerógena. Posteriormente son endocitados por las células eucariotas del sitio de ingreso (mucosa digestiva, respiratoria, etc), en donde permanecen en pequeñas inclusiones citoplasmáticas, convirtiéndose en cuerpos reticulares que se replican por fisión binaria en la sangre y linfonodos locales, distribuyéndose luego a los órganos blanco (Longbottom & Coulter, 2003).

Los cuerpos reticulares se multiplican y van llenando las inclusiones intracelulares, que comienzan a expandirse y llenan la célula, en 24-48 horas estos cuerpos se transforman de nuevo en cuerpos elementales, que se liberan al romperse la célula hospedadora, invadiendo las células cercanas. (Longbottom & Coulter, 2003).

Los cuerpos elementales de *C. abortus* son muy resistentes a factores químicos y físicos y al ambiente extracelular. Esto ocurre por la rigidez de la envoltura celular, que es

muy poco permeable y osmóticamente estable, lo cual le permite permanecer durante meses en el ambiente en espera de infectar un huésped (Longbottom & Coulter, 2003).

El cuerpo elemental es muy resistente en ambientes fríos, secos y oscuros, pueden sobrevivir en agua fría hasta por 17 días, y en heces secas, polvo o plumas por algunos meses. Las temperaturas elevadas reducen la posibilidad de sobrevivencia del patógeno y la criopreservación (como con el semen, por ejemplo), no inactiva la bacteria (Reinhold *et al*, 2011).

La bacteria toma la morfología aberrante para regular su replicación dependiendo de la disponibilidad de nutrientes que encuentren en las células que los fagocitan (macrófagos, monocitos y granulocitos). Esto hace que el agente sea mínimamente citotóxico y permanezca largo tiempo dentro de las células del hospedero, además permite que la enfermedad sea inmunomediada, persistente y asintomática (Reinhold *et al*, 2011).

C. abortus se ha reportado principalmente en ovinos y cabras, pero también otros huéspedes se ven afectados, como bovinos, suínos, equinos y aves (Reinhold *et al*, 2011). En los bovinos causa endometritis, vaginitis, metritis, retenciones placentarias, natimuecos o nacimientos prematuros (Praga-Ayala *et al*, 2014; Fonseca *et al*, 2015). También se ha relacionado con otros problemas como neumonía, conjuntivitis, enteritis, poliartritis, encefalitis y mastitis. Por su parte en los toros causa epididimitis, orquitis y vesiculitis (Praga-Ayala *et al*, 2014). Además de estos problemas también se ha reportado inflamación pulmonar crónica y retraso en el crecimiento (Reinhold *et al*, 2011). Las novillas que han sido infectadas permanecen como portadoras latentes y se mantienen así por el resto de su vida productiva, lo cual facilita la propagación del agente en los hatos (Praga-Ayala, 2014). El diagnóstico presuntivo de *C. abortus* se basa en el historial clínico, la confirmación requiere de análisis de laboratorio. Los diagnósticos indirectos, que detectan anticuerpos, se recomiendan para determinar prevalencias en una población, pero pueden ser utilizadas para confirmar una infección activa con *C. abortus*. En este último caso es imprescindible determinar un aumento significativo del título de anticuerpos en sueros pareados del animal afectado (Fonseca *et al*, 2015), lo cual se puede realizar con técnicas inmunoenzimáticas (Horigan *et al.*, 2009).

El diagnóstico directo de la bacteria se puede realizar mediante aislamiento en cultivo celular (Reinhold *et al*, 2011; Li *et al.*, 2005) o PCR, entre las cuales se han descrito las

técnicas que amplifican un segmento del gen MOMP (Creelan & McCullough, 2000), o los que amplifican segmentos de los genes 16s y 23s del ARN ribosomal (Hartley *et al.*, 2001; Opota *et al.*, 2017). A partir de muestras de leche y productos de los abortos (fetos -pulmones y abomaso, placentas y líquidos fetales) (Creelan & McCullough, 2000).

Las medidas preventivas y de control consisten en el uso de inseminación artificial en lugar de la monta natural, evitar el uso de leche con mastitis para la cría de terneros, no permitir que los bovinos entren en contacto con ovicaprinos (ya que funcionan como reservorios del agente), la identificación de animales portadores mediante serología o técnicas directas y eliminación de los mismos, analizar a los animales antes de entrar al hato y en la medida de lo posible, criar los reemplazos en la misma finca (Fonseca *et al.*, 2015). En bovinos se ha reportado que la vacuna disminuye la aparición de signos clínicos y la cantidad de bacterias que es eliminada en la leche, sin embargo, no previene la infección y la eliminación de bacterias en la leche (Biesenkamp-Uhe, 2007). El tratamiento se basa en el uso de tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicina y penicilina (Fonseca *et al.*, 2014).

4. Neosporosis

La neosporosis es una enfermedad causada por *Neospora caninum*, un protozooario intracelular. El agente pertenece al phylum Apicomplexa, clase Conoidasida, subclase Coccidia, orden Eucoccidioria, suborden Eimeriorina, familia Sarcocystidae, y género *Neospora* (NCBI, 2020). La enfermedad es común y reportada a nivel mundial, primero como una enfermedad de los perros y luego como una causa importante de problemas reproductivos en el ganado durante los últimos treinta años. El agente parasita caninos y rumiantes, causando abortos y muerte neonatal en los hatos bovinos afectados (Dubey & Schares, 2011). La enfermedad fue reportada por primera vez en perros en Noruega en 1984 (Bjerkas *et al.*, 1984), y desde entonces se ha reportado la presencia de anticuerpos también en búfalos de agua, zorros, coyotes, camélidos y felinos (Dubey *et al.*, 1998). En Costa Rica la neosporosis se ha reportado en perros (Morales *et al.*, 1995, Palavicini *et al.*, 2007), en bovinos (Pérez *et al.*, 1998; Romero *et al.*, 2002) así como en pequeños rumiantes (Villagra *et al.*, 2018, Villagra *et al.*, 2019).

Se ha determinado que el huésped definitivo del parásito es el perro (*Canis familiaris*) y el coyote (*Canis latrans*) (Dubey, 2003; Gondim *et al.* 2004). Los carnívoros se infectan con el protozooario al ingerir tejidos de rumiantes con quistes infectivos, que generalmente son productos de abortos que ocurren en las fincas o potreros.

El ciclo de vida del parásito comprende tres principales etapas: ooquistes, bradizoítos y taquizoítos. En primer lugar, los ooquistes se liberan en las heces de los perros. Esto ocurre tras la ingestión de bradizoítos, que se encuentran en los quistes tisulares y se multiplican lentamente. Estos quistes se ubican en el sistema nervioso central (SNC), tanto en el huésped definitivo canino como en los hospedadores intermediarios (herbívoros). Los bradizoítos causan una infección persistente e inactiva, controlada por la inmunidad del huésped. Por último, los taquizoítos consisten en la etapa de multiplicación rápida (que se estimula por la preñez en los bovinos) y causan lesiones al multiplicarse y romper las células. Con el inicio de la respuesta inmune y fisiológica del hospedador, la multiplicación de los taquizoítos disminuye y se diferencian en bradizoítos (infección persistente por los quistes tisulares). La aparición de la destrucción celular y de la enfermedad, depende de un equilibrio entre los taquizoítos que pueden penetrar y multiplicarse en las células del huésped y la capacidad del huésped para inhibir la multiplicación del parásito (Buxton *et al.*, 2002).

La infección en los bovinos ocurre por la ingestión de los ooquistes esporulados que se ubican en alimento o fuentes de agua contaminados con heces de perros. Durante la preñez el parásito invade las células del útero grávido, lo que explica los brotes de abortos que incluso suceden con bovinos que ya tenían una infección persistente antes de que se estableciera la gestación. Hasta el 95% de los terneros que logran nacer de madres seropositivas, pueden nacer clínicamente normales pero seropositivos (Buxton *et al.*, 2002).

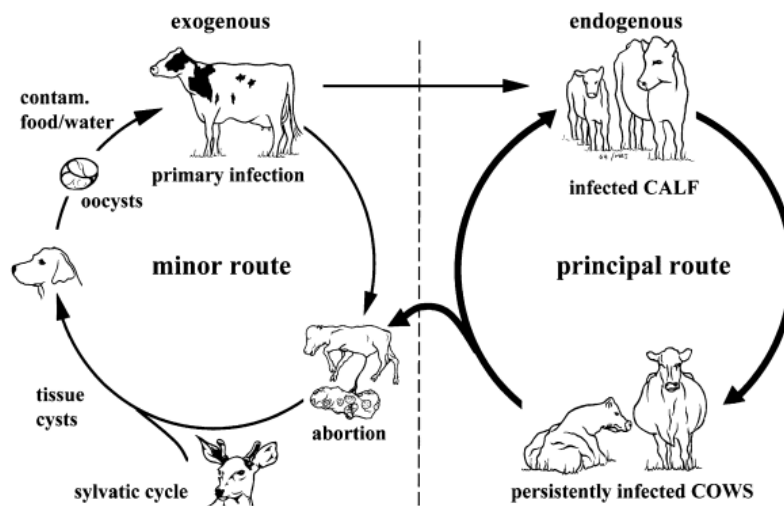


Figura 4. Ciclo de transmisión de *Neospora caninum* (Dubey *et al*, 2006).

Los abortos ocurren en las hembras que se infectan por primera vez, sin embargo, son más comunes las vacas que abortan por reactivación de una infección persistente durante una siguiente preñez. La parasitemia es seguida por invasión de la placenta y del feto, ocasionando el aborto por daño directo a la placenta y feto, y por la reacción inflamatoria (liberación de prostaglandinas), que tiene un efecto luteolítico y por ende abortivo. Los daños fetales se dan tanto por el efecto directo del parásito, como por la falta de irrigación y oxigenación, y finalmente por la acción de citoquinas proinflamatorias, que inducen la expulsión del feto. En infecciones experimentales se estableció, que entre más temprano ocurre la infección (primer trimestre de la preñez), el efecto sobre el feto es mayor, ocasionando la muerte de los fetos en la mayoría de los casos (Dubey, 2003), encontrándose placentitis, necrosis fetal y de la placenta (Dubey *et al*, 2006). Los caninos presentan problemas de parálisis muscular, disfagia, parálisis muscular respiratoria, incontinencia urinaria (Dubey *et al*, 2006).

La principal manifestación clínica en los bovinos es el aborto. Los fetos abortados entre los 3 y 8 meses de gestación generalmente presentan autólisis, aunque también tienden a momificarse y permanecer retenidos en el útero por algunos meses. Los fetos que mueren en el primer tercio de la gestación generalmente son reabsorbidos y lo que se observa clínicamente es la repetición del celo (Dubey *et al*, 2006). Los bovinos seropositivos tienen más probabilidades de abortar que los seronegativos, además el 95% de las crías de madres

seropositivas que logran llegar a término, nacen infectadas congénitamente, aunque se muestren clínicamente normales (Dubey *et al*, 2006).

En algunos casos se han observado signos neurológicos en los terneros infectados congénitamente menores de un mes de nacidos. Las características son: bajo peso al nacimiento, flexión de las extremidades anteriores o posteriores, ataxia, reflejo patelar disminuido, y propiocepción disminuida (Dubey *et al*, 2006).

La neosporosis bovina ha sido reportada mundialmente mediante técnicas indirectas como inmunofluorescencia indirecta y ELISA (Nishikawa *et al*, 2002; Sager *et al.*, 2001) y directas como la observación de quistes mediante histopatología, cultivo celular y análisis mediante PCR (Gottstein *et al.*, 1998; Razmi, 2009).

Las pruebas serológicas son muy útiles en el diagnóstico de *N. caninum*. Los animales positivos pueden indicar la presencia del agente en el hato, exposición previa al agente o incluso una infección persistente. Los sueros pareados con títulos significativamente diferentes pueden indicar a *N. caninum* como posible causa de aborto por infección reciente o reactivación de una infección latente. Por otro lado, una prueba negativa no descarta la presencia del agente porque la síntesis de anticuerpos depende de la edad de gestación, el nivel de exposición al agente y el tiempo entre la infección y el aborto (Dubey, 2003). Existen varias pruebas serológicas disponibles para la detección de anticuerpos para *N. caninum*, como por ejemplo ELISA, IFAT, Western Blot. Estas tres técnicas han demostrado ser capaces de detectar animales seropositivos de modo que no difieren significativamente entre ellas. En el caso específico del ELISA indirecto de la compañía ID-VET, en un análisis comparativo con ELISAs de otras casas comerciales, se obtuvieron valores de sensibilidad y especificidad de más del 95% (Álvarez-García *et al*, 2013b; Dubey, 2003; Andreotti *et al*, 2009). Por este motivo es la prueba elegida para la realización del análisis serológico para anticuerpos de *N. caninum* en el presente estudio.

Los tipos de muestra que se recomiendan para diagnosticar el parásito en los fetos mediante histopatología, inmunohistoquímica, técnicas moleculares o cultivo celular son: cerebro, hígado, corazón, placenta, fluidos corporales y suero. Aunque el parásito puede ubicarse en diferentes tejidos, el cerebro fetal es el órgano más consistentemente afectado. En caso de lisis del feto se recomienda fijar los tejidos en formalina al 10% y realizar el análisis histopatológico con hematoxilina-eosina (HE). La lesión más común es una

encefalitis focal con necrosis e inflamación no supurativa. Mediante inmunohistoquímica es posible detectar quistes de *N. caninum* en los tejidos lisados, pueden no ser visibles en la histopatología, sin embargo, es una técnica poco sensible. En la placenta se pueden encontrar también lesiones típicas, pero es más difícil encontrar (Dubey, 2003).

El análisis mediante PCR dependerá del nivel de lisis del feto (Dubey, 2003), y se basa en amplificar la región ITS-1 y la secuencia Nc-5 (Collantes-Fernández *et al.*, 2002). El aislamiento de *N. caninum* en cultivo celular se realiza en células VERO, las cuales se incuban con DMEM, suero fetal bovino y antibiótico al 1% (10,000 UI de Penicilina y 10,000 µg de Estreptomina/ml). (Basso *et al.*, 2008).

Se recomienda el control de caninos y coyotes en los hatos, y evitar que estos consuman productos de abortos (Dubey, 2003). Algunos autores recomiendan el sacrificio de animales seropositivos debido a la infección latente que se reactiva durante la preñez, otros prefieren cruzar estos animales con toros de carne, para así seguir utilizándolos, pero no perpetuando la infección en el hato. Es importante analizar serológicamente el hato, para promover la permanencia de animales seronegativos, y reemplazar solamente con animales seronegativos. Los tratamientos recomendados incluyen clindamicina, sulfadiazina y pirimetamina (Dubey, 2003).

5. Toxoplasmosis

La toxoplasmosis es una enfermedad causada por *Toxoplasma gondii*, un parásito coccidio formador de quistes, el cual parasita animales y seres humanos. En rumiantes ocasiona abortos por infección congénita (Ugla & Buxton, 1990; Sánchez-Sánchez *et al.*, 2018). *T. gondii* es un protozoo intracelular obligado perteneciente al phylum Apicomplexa, clase Conoidasida, subclase Coccidia, orden Eucoccidiorida, suborden Eimeriorina, familia Sarcocystidae y género *Toxoplasma* con *Toxoplasma gondii* como única especie del género (NCBI, 2020). La enfermedad se encuentra distribuida a nivel mundial, afectando un 25-50% de la población mundial y es reconocida por la Autoridad de Seguridad Alimentaria Europea como la zoonosis parasitaria con mayor incidencia en los humanos (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2018). En Costa Rica se tienen reportes de la presencia del parásito en heces de gatos desde 1975 (Frenkel *et al.*, 1975).

Los miembros de la familia Felidae, en especial los gatos domésticos (*Felis catus*), son los hospedadores definitivos del parásito, los cuales se infectan al alimentarse de roedores o aves silvestres con quistes en sus tejidos, y en menor manera, al ingerir ooquistes eliminados por otros felinos. Todos los mamíferos y aves pueden ser hospedadores intermediarios de *T. gondii* (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2018).

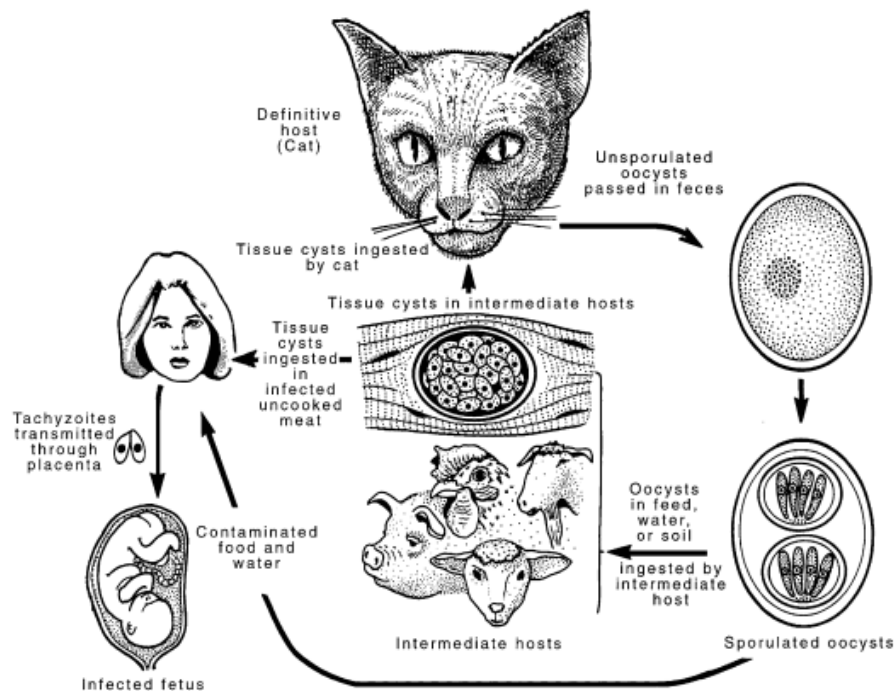


Figura 5. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* (Dubey *et al.*, 2006).

Cuando los gatos ingieren carne infectada, los bradizoítos enquistados en los tejidos se liberan gracias a las enzimas proteolíticas del tracto digestivo, penetrando la mucosa intestinal y alcanzando tejidos extraintestinales en unas pocas horas post infección. Otros bradizoítos penetran las células epiteliales del intestino delgado, y empiezan a desarrollar un gran número de generaciones de esquizontes asexuales. Los organismos (merozoítos) que se liberan de los esquizontes constituyen gametos femeninos y masculinos. Una vez que el gameto femenino es fertilizado por el masculino, se forma una pared de ooquiste alrededor del gameto fertilizado. Cuando los ooquistes maduran se liberan al lumen intestinal mediante la ruptura de células epiteliales. El parásito permanece en los tejidos intestinales y extraintestinales por varios meses, algunos posiblemente durante toda la vida del gato (Dubey *et al.*, 2006).

Los ooquistes se forman solamente en los felinos (domésticos y silvestres), quienes liberan los ooquistes al ambiente, los cuales no son esporulados (no infectivos). La esporulación ocurre, dependiendo de la oxigenación, humedad y temperatura ambiental (1 a 5 días en el medio ambiente) (Dubey *et al.*, 2006). Los hospedadores intermediarios, como por ejemplo pequeños rumiantes se infectan debido a la ingesta de agua y alimento contaminado con ooquistes infectivos. Sin embargo, también es posible la transmisión vertical, ya sea por una infección nueva o por la reactivación de una infección crónica (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2018).

Las hembras infectadas desarrollan inmunidad, lo cual las protege contra abortos en caso de futuras infecciones, con excepción de las cabras, en las cuales se reportan abortos en varias preñeces. Las infecciones tempranas (primer tercio de la gestación) usualmente resultan en la muerte fetal, mientras que las infecciones más tardías (desde la mitad de la gestación en adelante) causan otros efectos como neonatos débiles, natimueertos o momificaciones (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2018).

En los seres humanos, la mayoría de las infecciones se debe a la ingesta de carne mal cocinada, así como fuentes de agua contaminadas, sobre todo en países tropicales y subtropicales (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2018). Cuando la infección ocurre en mujeres gestantes, puede ocasionar lesiones en el cerebro, los ojos, hasta la muerte del feto (Dubey *et al.*, 2006).

En rumiantes causa muerte embrionaria y reabsorción, muerte fetal, momificación, abortos, natimueertos y muerte neonatal. La enfermedad se presenta también en cerdos, caninos, felinos, aves, marsupiales, conejos, mamíferos marinos, entre otros (Dubey *et al.*, 2006).

El diagnóstico de la toxoplasmosis se basa en métodos histológicos, serológicos, moleculares y cultivo celular, así como en la combinación de estos. (Dubey *et al.*, 2006).

Las pruebas serológicas que se usan son hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia indirecta, aglutinación directa, y ELISA. La detección de anticuerpos en un suero solo demuestra que el individuo fue expuesto al parásito, sin embargo, el análisis de sueros pareados (análisis de dos sueros en un intervalo de 2-4 semanas, mostrando un incremento/disminución significativa del título) indica una infección aguda (Dubey *et al.*, 2006).

Para los bovinos se ha determinado que en el caso de la prueba de aglutinación no es siempre indicadoras de la presencia de quistes intramusculares (Opsteegh *et al*, 2019). Sin embargo, la prueba de ELISA indirecto de la casa ID-Vet ha sido recomendada tanto por la sensibilidad como especificidad para el diagnóstico indirecto de la toxoplasmosis (Mangili *et al*, 2009).

El cultivo celular o en animales de laboratorio se puede hacer a partir de pacientes infectados, la inoculación se puede hacer con secreciones, excreciones, fluidos corporales, tejidos tomados mediante biopsia y tejidos con lesiones macroscópicas tomadas post mortem. Estas muestras no solo permiten la inoculación, sino también el análisis molecular mediante PCR (Dubey *et al.*, 2006), en el cual se amplifican los genes B1 y P30 (Fuentes *et al.*, 1996; Buchbinder *et al.*, 2003; Reischl *et al.*, 2003).

Las temperaturas extremas (frío o calor) matan al parásito. La carne debe ser cocinada al menos a 67°C antes de ser consumida. Después de manejar carne cruda se recomienda lavar las manos con agua y jabón. Las mujeres embarazadas deben evitar el contacto con las heces de gato, cajas de arena, tierra y carne cruda. Los gatos deben ser alimentados únicamente con alimento seco, enlatado o comida cocinada, además la litera debe ser limpiada diariamente. Se recomienda el uso de guantes cuando se realiza jardinería o siembra de vegetales, y toda fruta o vegetal debe ser bien lavada antes de ser consumida. Las personas deben evitar tomar agua de fuentes como lagos, lagunas y ríos. (Dubey *et al.*, 2006).

El tratamiento se realiza con sulfadiazina y primetamina, que funcionan mejor en las etapas agudas de la enfermedad (cuando se da la multiplicación activa del parásito), sin embargo, no eliminan la infección. (Dubey *et al.*, 2006).

6. Referencias bibliográficas

- Agerholm, J. S. (2013). *Coxiella burnetii* associated reproductive disorders in domestic animals-a critical review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55(1), 13.
- Aitken I. D., Woldehiwet Z. and Ristic M. (1993). Ovine chlamydial abortion. In *Rickettsial and Chlamydial Diseases of Domestic Animals*. Pergamon Press, Oxford. 349-360.
- Álvarez-García, G., Frey, C. F., Mora, L. M. O., & Schares, G. (2013a). A century of bovine besnoitiosis: an unknown disease re-emerging in Europe. *Trends in parasitology*, 29(8), 407-415.

- Alvarez-García, G., García-Culebras, A., Gutiérrez-Expósito, D., Navarro-Lozano, V., Pastor-Fernández, I., & Ortega-Mora, L. M. (2013b). Serological diagnosis of bovine neosporosis: a comparative study of commercially available ELISA tests. *Veterinary parasitology*, 198(1-2), 85-95.
- Álvarez-García, G., García-Lunar, P., Gutiérrez-Expósito, D., Shkap, V., & Ortega-Mora, L. M. (2014). Dynamics of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle. *Parasitology*, 141(11), 1419-1435.
- Ajzenberg, D., Dumètre, A., & Dardé, M. L. (2005). Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*. *Journal of clinical microbiology*, 43(4), 1940-1943.
- Andreotti, R., Matos, M. D. F. C., Gonçalves, K. N., Oshiro, L. M., Lima-Junior, M. S. D. C., Paiva, F., & Leite, F. L. (2009). Comparison of indirect ELISA based on recombinant protein NcSRS2 and IFAT for detection of *Neospora caninum* antibodies in sheep. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 18(2), 19-22.
- Arricau-Bouvery, N., & Rodolakis, A. (2005). Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis?. *Veterinary research*, 36(3), 327-349.
- Arroyo, U., Nieto, J. G., JL Cajero Avelar, S., Castillo, G., Hallin, M. K. I., Harris, E., ... & MC Thakar, C. V. (2014). Código sanitario para los animales terrestres (No. L73-06). Organización Mundial de Sanidad Animal, París (Francia).
- Basso, W., Schares, S., Bärwald, A., Herrmann, D. C., Conraths, F. J., Pantchev, N., ... & Schares, G. (2009). Molecular comparison of *Neospora caninum* oocyst isolates from naturally infected dogs with cell culture-derived tachyzoites of the same isolates using nested polymerase chain reaction to amplify microsatellite markers. *Veterinary parasitology*, 160(1-2), 43-50.
- Basso, W., Schares, G., Gollnick, N. S., Rütten, M., & Deplazes, P. (2011). Exploring the life cycle of *Besnoitia besnoiti*—experimental infection of putative definitive and intermediate host species. *Veterinary parasitology*, 178(3), 223-234.
- Basson, P. A., McCully, R. M., & Bigalke, R. D. (1970). Observations on the pathogenesis of bovine and antelope strains of *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912) infection in cattle and rabbits.

- Beare, P. A., Gilk, S. D., Larson, C. L., Hill, J., Stead, C. M., Omsland, A., ... & Heinzen, R. A. (2011). Dot/Icm type IVB secretion system requirements for *Coxiella burnetii* growth in human macrophages. *MBio*, 2(4), e00175-11.
- Bjerkås I, Mohn SF, Presthus J. (1984). Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z Parasitenk.* 1984;70:271–274.
- Berri, M., Souriau, A., Crosby, M., Crochet, D., Lechopier, P., & Rodolakis, A. (2001). Relationships between the shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep. *The veterinary record*, 148(16), 502-505.
- Berri, M., Rousset, E., Champion, J. L., Russo, P., & Rodolakis, A. (2007). Goats may experience reproductive failures and shed *Coxiella burnetii* at two successive parturitions after a Q fever infection. *Research in veterinary science*, 83(1), 47-52.
- Bielawska-Drózd, A., Cieślik, P., Mirski, T., Gaweł, J., Michalski, A., Niemcewicz, M., ... & Kocik, J. (2014). Prevalence of *Coxiella burnetii* in environmental samples collected from cattle farms in Eastern and Central Poland (2011–2012). *Veterinary microbiology*, 174(3), 600-606.
- Biesenkamp-Uhe, C., Li, Y., Hehnen, H. R., Sachse, K., & Kaltenboeck, B. (2007). Therapeutic *Chlamydomytila abortus* and *C. pecorum* vaccination transiently reduces bovine mastitis associated with *Chlamydomytila* infection. *Infection and immunity*, 75(2), 870-877.
- Brennan, R. E., & Samuel, J. E. (2003). Evaluation of *Coxiella burnetii* antibiotic susceptibilities by real-time PCR assay. *Journal of clinical microbiology*, 41(5), 1869-1874.
- Buchbinder, S., Blatz, R., & Rodloff, A. C. (2003). Comparison of real-time PCR detection methods for B1 and P30 genes of *Toxoplasma gondii*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 45(4), 269-271.
- Burnard, D., & Polkinghorne, A. (2016). Chlamydial infections in wildlife—conservation threats and/or reservoirs of ‘spill-over’ infections?. *Veterinary microbiology*, 196, 78-84.
- Buxton, D., McAllister, M. M., & Dubey, J. P. (2002). The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends in parasitology*, 18(12), 546-552.

- Capo, C., Lindberg, F. P., Meconi, S., Zaffran, Y., Tardei, G., Brown, E. J., ... & Mege, J. L. (1999). Subversion of monocyte functions by *Coxiella burnetii*: impairment of the cross-talk between $\alpha\beta3$ integrin and CR3. *The Journal of Immunology*, 163(11), 6078-6085.
- CDC. (2016). Q Fever: Epidemiology and Statistics. <https://www.cdc.gov/qfever/stats/index.html> (consultado el 01-11-2018).
- Chosewood, L. C. (2007). *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories*. Diane Publishing.
- Clamidiosis ovina, O. I. E. (2012). *Manual de la OIE sobre animales terrestres*. 2008. Capítulo, 2(7).
- Collantes-Fernández, E., Zaballos, Á., Álvarez-García, G., & Ortega-Mora, L. M. (2002). Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. *Journal of clinical microbiology*, 40(4), 1194-1198.
- Collingro, A., Köstlbacher, S., & Horn, M. (2020). *Chlamydiae in the Environment*. Trends in Microbiology.
- Cortes, H. C. E., Nunes, S., Reis, Y., Staubli, D., Vidal, R., Sager, H., ... & Gottstein, B. (2006). Immunodiagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection by ELISA and Western blot. *Veterinary parasitology*, 141(3), 216-225.
- Cortes, H. C., Reis, Y., Gottstein, B., Hemphill, A., Leitão, A., & Müller, N. (2007a). Application of conventional and real-time fluorescent ITS1 rDNA PCR for detection of *Besnoitia besnoiti* infections in bovine skin biopsies. *Veterinary parasitology*, 146(3), 352-356.
- Cortes, H. C. E., Müller, N., Esposito, M., Leitao, A., Naguleswaran, A., & Hemphill, A. (2007b). In vitro efficacy of nitro-and bromo-thiazolyl-salicylamide compounds (thiazolides) against *Besnoitia besnoiti* infection in Vero cells. *Parasitology*, 134(07), 975-985.
- Cortes, H., Leitao, A., Gottstein, B., & Hemphill, A. (2014). A review on bovine besnoitiosis: a disease with economic impact in herd health management, caused by *Besnoitia besnoiti* (Franco and Borges, 1916). *Parasitology*, 141(11), 1406-1417.

- Creelan, J. L., & McCullough, S. J. (2000). Evaluation of strain-specific primer sequences from an abortifacient strain of ovine *Chlamydomphila abortus* (*Chlamydia psittaci*) for the detection of EAE by PCR. *FEMS microbiology letters*, 190(1), 103-108.
- DeGraves, F. J., Kim, T., Jee, J., Schlapp, T., Hehnen, H. R., & Kaltenboeck, B. (2004). Reinfection with *Chlamydomphila abortus* by uterine and indirect cohort routes reduces fertility in cattle preexposed to *Chlamydomphila*. *Infection and immunity*, 72(5), 2538-2545.
- Dubey, J. P. (2003). Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean journal of parasitology*, 41(1), 1.
- Dubey, J. P., Buxton, D., & Wouda, W. (2006). Pathogenesis of bovine neosporosis. *Journal of comparative pathology*, 134(4), 267-289.
- Dubey, J. P., Hattel, A. L., Lindsay, D. S., & Topper, M. J. (1988). Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission.
- Dubey, J. P., & Porterfield, M. L. (1990). *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. *The Journal of parasitology*, 732-734.
- Dubey, J. P., van Wilpe, E., Blignaut, D. J. C., Schares, G., & Williams, J. H. (2013). Development of early tissue cysts and associated pathology of *Besnoitia besnoiti* in a naturally infected bull (*Bos taurus*) from South Africa. *The Journal of parasitology*, 99(3), 459-466.
- Duron, O., Noël, V., McCoy, K. D., Bonazzi, M., Sidi-Boumedine, K., Morel, O., ... & Arnathau, C. (2015). The recent evolution of a maternally-inherited endosymbiont of ticks led to the emergence of the Q fever pathogen, *Coxiella burnetii*. *PLoS Pathog*, 11(5), e1004892.
- EFSA European Food Safety Authority, 2010. Bovine Besnoitiosis: an emerging disease in Europe. Scientific statement on Bovine Besnoitiosis, Question No EFSA-Q-2009-00879, adopted 28.01.2010, *EFSA Journal* 8, 1499.
- Eldin, C., Mélenotte, C., Mediannikov, O., Ghigo, E., Million, M., Edouard, S., ... & Raoult, D. (2017). From Q fever to *Coxiella burnetii* infection: a paradigm change. *Clinical microbiology reviews*, 30(1), 115-190.

- Esteban-Gil, A., Grisez, C., Prevot, F., Florentin, S., Decaudin, A., Picard-Hagen, N., ... & Corboz, N. (2014). No detection of *Besnoitia besnoiti* DNA in the semen of chronically infected bulls. *Parasitology research*, 113(6), 2355-2362.
- Fallas-Elizondo, D., Calderón, J. C., Romero-Zuñiga, J. J., & Dolz, G. (2018). Presencia serológica de *Besnoitia besnoiti*, *Toxoplasma gondii*, *Coxiella burnetii* y *Chlamydia abortus* en hatos bovinos de Costa Rica. *Ciencias Veterinarias*, 36(3), 26-26.
- Fariñas, M. T. F., & Collado, C. M. (2010). Infección por *Coxiella burnetii* (fiebre Q). *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 28, 29-32.
- Fernandez-Garcia, A., Alvarez-Garcia, G., Risco-Castillo, V., Aguado-Martinez, A., Marugan-Hernandez, V., & Ortega-Mora, L. M. (2009). Pattern of recognition of *Besnoitia besnoiti* tachyzoite and bradyzoite antigens by naturally infected cattle. *Veterinary parasitology*, 164(2), 104-110.
- Flanagan, R. S., Jaumouillé, V., & Grinstein, S. (2012). The cell biology of phagocytosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 7, 61-98.
- Fonseca Salazar, L. (2014). *Chlamydia abortus* en ganado lechero de la zona norte de Heredia y Alajuela, Costa Rica.
- Forsbach-Birk, V., Foddis, C., Simnacher, U., Wilkat, M., Longbottom, D., Walder, G., ... & Essig, A. (2013). Profiling antibody responses to infections by *Chlamydia abortus* enables identification of potential virulence factors and candidates for serodiagnosis. *PLoS One*, 8(11).
- Frenkel, J. K., Ruiz, A., & Chinchilla, M. (1975). Soil survival of *Toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 24(3), 439-443.
- Fuentes, I., Rodriguez, M., Domingo, C. J., del Castillo, F. E. R. N. A. N. D. O., Juncosa, T., & Alvar, J. (1996). Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(10), 2368-2371.
- García-Lunar, P., Ortega-Mora, L. M., Schares, G., Gollnick, N. S., Jacquiet, P., Grisez, C., ... & Álvarez-García, G. (2013). An Inter-Laboratory Comparative Study of Serological Tools Employed in the Diagnosis of *Besnoitia besnoiti* Infection in Bovines. *Transboundary and emerging diseases*, 60(1), 59-68.

- Goldman, M., & Pipano, E. (1983). Serological studies on bovine besnoitiosis in Israel. *Tropical animal health and production*, 15(1), 32-38.
- Gondim, L., McAllister, M., Mateus-Pinilla, N., Pitt, W. , Mech, L. & Nelson, E. (2004). Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. *Journal of parasitology*, 90 (6), 1361-1365.
- Gottstein, B., Hentrich, B., Wyss, R., Thür, B., Busato, A., Stärk, K. D. C., & Müller, N. (1998). Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. *International journal for parasitology*, 28(4), 679-691.
- Gutiérrez-Expósito, D., Arnal, M. C., Martínez-Durán, D., Regidor-Cerrillo, J., Revilla, M., de Luco, D. L. F., ... & Arenas-Montes, A. (2016). The role of wild ruminants as reservoirs of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle. *Veterinary parasitology*, 223, 7-13.
- Hartley, J. C., Kaye, S., Stevenson, S., Bennett, J., & Ridgway, G. (2001). PCR Detection and Molecular Identification of *Chlamydiaceae* Species. *Journal of clinical microbiology*, 39(9), 3072-3079.
- Horigan, M.W. 2009. *Chlamydia abortus* – An evaluation of three commercial ELISAs. 14th International Symposium of the World Association of Veterinary laboratory Diagnosticians (WAVLD), 17-20 Jun. 2009, Madrid, Spain.
- Howe, D., Melničáková, J., Barák, I., & Heinzen, R. A. (2003). Fusogenicity of the *Coxiella burnetii* parasitophorous vacuole. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990(1), 556-562.
- IDVET. (2016). ID Screen® Q Fever Indirect Multi-species sensitivity Quality Control Data Sheet[Pamphlet]. Montpellier: IDVET.
- Jacquet, P., Liénard, E., & Franc, M. (2010). Bovine besnoitiosis: epidemiological and clinical aspects. *Veterinary parasitology*, 174(1), 30-36.
- Janitschke, K., De Vos, A. J., & Bigalke, R. D. (1984). Serodiagnosis of bovine besnoitiosis by ELISA and immunofluorescence tests. *The Onderstepoort journal of veterinary research*, 51(4), 239-243.
- Jaton, K., Peter, O., Raoult, D., Tissot, J. D., & Greub, G. (2013). Development of a high throughput PCR to detect *Coxiella burnetii* and its application in a diagnostic laboratory over a 7-year period. *New microbes and new infections*, 1(1), 6-12.

- Kersh, G. J., Wolfe, T. M., Fitzpatrick, K. A., Candee, A. J., Oliver, L. D., Patterson, N. E., ... & Massung, R. F. (2010). Presence of *Coxiella burnetii* DNA in the environment of the United States, 2006 to 2008. *Applied and environmental microbiology*, 76(13), 4469-4475.
- Kim, S. G., Kim, E. H., Lafferty, C. J., & Dubovi, E. (2005). *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples, United States. *Emerging infectious diseases*, 11(4), 619.
- Kılıç, A., Kalender, H., Koç, O., Kılınç, Ü., Irehan, B., & Berri, M. (2016). Molecular investigation of *Coxiella burnetii* infections in aborted sheep in eastern Turkey. *Iranian journal of veterinary research*, 17(1), 41.
- Klee, S. R., Tyczka, J., Ellerbrok, H., Franz, T., Linke, S., Baljer, G., & Appel, B. (2006). Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. *Bmc Microbiology*, 6(1), 2.
- Larson, C. L., & Heinzen, R. A. (2017). High-content imaging reveals expansion of the endosomal compartment during *Coxiella burnetii* parasitophorous vacuole maturation. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7.
- Li, D., Vaglenov, A., Kim, T., Wang, C., Gao, D., & Kaltenboeck, B. (2005). High-yield culture and purification of Chlamydiaceae bacteria. *Journal of microbiological methods*, 61(1), 17-24.
- Liu, L., Baoliang, X., Yingqun, F., Ming, L., Yu, Y., Yong, H., ... & Xiaohong, S. (2013). *Coxiella burnetii* in rodents on Heixiazi Island at the Sino-Russian Border. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 88(4), 770-773.
- Liu, Q., Singla, L. D., & Zhou, H. (2012). Vaccines against *Toxoplasma gondii*: status, challenges and future directions. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 8(9), 1305-1308.
- Longbottom, D., & Coulter, L. J. (2003). Animal chlamydioses and zoonotic implications. *Journal of comparative pathology*, 128(4), 217-244.
- Madariaga, M. G., Rezai, K., Trenholme, G. M., & Weinstein, R. A. (2003). Q fever: a biological weapon in your backyard. *The Lancet infectious diseases*, 3(11), 709-721.
- Mangili, P. M., Vesco, G., Feliziani, F., Paoloni, A., Menichelli, M., Cagiola, M., ... & Papa, P. (2009). Development and evaluation of the performance of an in-house ELISA to

- be used for the indirect diagnosis of Toxoplasmosis in sheep. Proceeding of SIDILV, Parma (Italy).
- Maurin, M., & Raoult, D. (1999). Q Fever. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 518–553.
- Mediannikov, O., Fenollar, F., Socolovschi, C., Diatta, G., Bassene, H., Molez, J. F., ... & Raoult, D. (2010). *Coxiella burnetii* in humans and ticks in rural Senegal. *PLoS neglected tropical diseases*, 4(4), e654.
- Mege, J. L., Maurin, M., Capo, C., & Raoult, D. (1997). *Coxiella burnetii*: the ‘query’ fever bacterium: A model of immune subversion by a strictly intracellular microorganism. *FEMS microbiology reviews*, 19(4), 209-217.
- Morales, J. A., Dubey, J. P., Rodriguez, F., Esquivel, R. L., & Fritz, D. (1995). Neosporosis and toxoplasmosis-associated paralysis in dogs in Costa Rica. *Applied parasitology*, 36, 179-179.
- Mori, M., Boarbi, S., Michel, P., Bakinahe, R., Rits, K., Wattiau, P., & Fretin, D. (2013). In vitro and in vivo infectious potential of *Coxiella burnetii*: a study on Belgian livestock isolates. *PLoS One*, 8(6), e67622.
- Nasir, A., Lanyon, S. R., Schares, G., Anderson, M. L., & Reichel, M. P. (2012). Sero-prevalence of *Neospora caninum* and *Besnoitia besnoiti* in South Australian beef and dairy cattle. *Veterinary parasitology*, 186(3), 480-485.
- NCBI. (2020). Taxonomy browser: *Neospora caninum*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=29176> (consultado 28-02-2020).
- NCBI. (2020). Taxonomy browser: *Toxoplasma gondii*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5811> (consultado 13-03-2020).
- Nishikawa, Y., Claveria, F. G., Fujisaki, K., & Nagasawa, H. (2002). Studies on serological cross-reaction of *Neospora caninum* with *Toxoplasma gondii* and *Hammondia heydorni*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 64(2), 161-164.
- Olias, P., Schade, B., & Mehlhorn, H. (2011). Molecular pathology, taxonomy and epidemiology of *Besnoitia* species (Protozoa: Sarcocystidae). *Infection, Genetics and Evolution*, 11(7), 1564-1576.

- Opota, O., Brouillet, R., Greub, G., & Jaton, K. (2017). Methods for real-time PCR-based diagnosis of *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, and *Chlamydia abortus* infections in an opened molecular diagnostic platform. In *Diagnostic Bacteriology* (pp. 171-181). Humana Press, New York, NY.
- Opsteegh, M., Spano, F., Aubert, D., Balea, A., Burrells, A., Cherchi, S., ... & Van Der Giessen, J. W. B. (2019). The relationship between the presence of antibodies and direct detection of *Toxoplasma gondii* in slaughtered calves and cattle in four European countries. *International journal for parasitology*, 49(7), 515-522.
- Page, L. A. (1966). Revision of the family Chlamydiaceae Rake (Rickettsiales): unification of the psittacosis-lymphogranuloma venereum-trachoma group of organisms in the genus *Chlamydia* Jones, Rake and Stearns, 1945. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 16(2), 223-252.
- Palavicini, P., Romero, J. J., Dolz, G., Jiménez, A. E., Hill, D. E., & Dubey, J. P. (2007). Fecal and serological survey of *Neospora caninum* in farm dogs in Costa Rica. *Veterinary parasitology*, 149(3-4), 265-270.
- Pérez, E., Gonzalez, O., Dolz, G., Morales, J. A., Barr, B., & Conrad, P. A. (1998). First report of bovine neosporosis in dairy cattle in Costa Rica. *Veterinary record*, 142(19), 520-521.
- Praga-Ayala, A. R., de Oca-Jiménez, R. M., Ortega-Santana, C., Salem, A., Cubillos-Godoy, V., Fernández-Rosas, P., & Monroy-Salazar, H. G. (2014). Low seroprevalence of *Chlamydia abortus* in dairy cows of hot environment in southern of Mexico. *Life Science Journal*, 11(11).
- Rahimi, E., Doosti, A., Ameri, M., Kabiri, E., & Sharifian, B. (2010). Detection of *Coxiella burnetii* by nested PCR in bulk milk samples from dairy bovine, ovine, and caprine herds in Iran. *Zoonoses and public health*, 57(7-8), e38-e41.
- Raoult, D., Torres, H., & Drancourt, M. (1991). Shell-vial assay: evaluation of a new technique for determining antibiotic susceptibility, tested in 13 isolates of *Coxiella burnetii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 35(10), 2070-2077.
- Razmi, G. (2009). Fecal and molecular survey of *Neospora caninum* in farm and household dogs in Mashhad area, Khorasan province, Iran. *The Korean journal of parasitology*, 47(4), 417.

- Reinhold, P., Sachse, K., & Kaltenboeck, B. (2011). Chlamydiaceae in cattle: commensals, trigger organisms, or pathogens? *The Veterinary Journal*, 189(3), 257-267.
- Reischl, U., Bretagne, S., Krüger, D., Ernault, P., & Costa, J. M. (2003). Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC infectious diseases*, 3(1), 7.
- Roman, M. J., Crissman, H. A., Samsonoff, W. A., Hechemy, K. E., & Baca, O. G. (1991). Analysis of *Coxiella burnetii* isolates in cell culture and the expression of parasite-specific antigens on the host membrane surface. *Acta virologica*, 35(6), 503-510.
- Sachse, K., Bavoil, P. M., Kaltenboeck, B., Stephens, R. S., Kuo, C. C., Rosselló-Móra, R., & Horn, M. (2015). Emendation of the family Chlamydiaceae: proposal of a single genus, *Chlamydia*, to include all currently recognized species. *Systematic and applied microbiology*, 38(2), 99-103.
- Sager, H., Fischer, I., Furrer, K., Strasser, M., Waldvogel, A., Boerlin, P., ... & Gottstein, B. (2001). A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. *Veterinary Parasitology*, 102(1-2), 1-15.
- Salazar, L. F., Herrera, J. M., Zúñiga, J. J. R., & Dolz, G. (2015). *Chlamydia abortus* in Dairy Farms in Costa Rica. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 5(4), 179-185.
- Sánchez-Sánchez, R., Vázquez, P., Ferre, I., & Ortega-Mora, L. M. (2018). Treatment of toxoplasmosis and neosporosis in farm ruminants: state of knowledge and future trends. *Current topics in medicinal chemistry*, 18(15), 1304-1323.
- Schares, G., Basso, W., Majzoub, M., Cortes, H. C. E., Rostaher, A., Selmair, J., ... & Gollnick, N. S. (2009). First in vitro isolation of *Besnoitia besnoiti* from chronically infected cattle in Germany. *Veterinary parasitology*, 163(4), 315-322.
- Schares, G., Basso, W., Majzoub, M., Rostaher, A., Scharr, J. C., Langenmayer, M. C., ... & Haupt, T. (2011). Evaluation of a commercial ELISA for the specific detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti*. *Veterinary parasitology*, 175(1-2), 52-59.
- Seshadri, R., Paulsen, I. T., Eisen, J. A., Read, T. D., Nelson, K. E., Nelson, W. C., ... & Deboy, R. T. (2003). Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(9), 5455-5460.

- Sheleby-Elías, J., Solórzano-Morales, Á., Romero-Zuñiga, J. J., & Dolz, G. (2013). Molecular detection and genotyping of *Chlamydia psittaci* in captive Psittacines from Costa Rica. *Veterinary medicine international*, 2013.
- Slaba, K., Skultety, L., & Toman, R. (2005). Efficiency of various serological techniques for diagnosing *Coxiella burnetii* infection. *Acta Virol*, 49(2), 123-7.
- Stewart, D., Shieh, Y. C., Tortorello, M., Kukreja, A., Shazer, A., & Schlessner, J. (2015). Quantitation of viable *Coxiella burnetii* in milk using an integrated cell culture-polymerase chain reaction (ICC-PCR) assay. *Journal of Dairy Research*, 82(4), 478-484.
- Sting, R., Lerke, E., Hotzel, H., Jodas, S., Popp, C., & Hafez, H. M. (2006). Comparative studies on detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* in meat turkey flocks using cell culture, ELISA, and PCR. *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 113(2), 50-54.
- Taurel, A. F., Guatteo, R., Lehebel, A., Joly, A., & Beaudeau, F. (2014). Vaccination using phase I vaccine is effective to control *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy cattle herds. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 37(1), 1-9.
- Uggla, A., & Buxton, D. (1990). Immune responses against *Toxoplasma* and *Sarcocystis* infections in ruminants: diagnosis and prospects for vaccination. *Rev Sci Tech*, 9(2), 441-62.
- Uzeda, R. S., Andrade, M. R., Corbellini, L. G., Antonello, A. M., Vogel, F. S., & Gondim, L. F. P. (2014). Frequency of antibodies against *Besnoitia besnoiti* in Brazilian cattle. *Veterinary parasitology*, 199(3), 242-246.
- Van den Brom, R., Van Engelen, E., Roest, H. I. J., van der Hoek, W., & Vellema, P. (2015). *Coxiella burnetii* infections in sheep or goats: an opinionated review. *Veterinary microbiology*, 181(1), 119-129.
- Vanderburg, S., Rubach, M. P., Halliday, J. E., Cleaveland, S., Reddy, E. A., & Crump, J. A. (2014). Epidemiology of *Coxiella burnetii* infection in Africa: a OneHealth systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(4), e2787.

- Van Schaik, E. J., Chen, C., Mertens, K., Weber, M. M., & Samuel, J. E. (2013). Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *Nature Reviews. Microbiology*, 11(8), 561–573. <http://doi.org/10.1038/nrmicro3049>.
- Villagra-Blanco, R., Dolz, G., Montero-Caballero, D., & Romero-Zúñiga, J. J. (2015). Detection of antibodies against *Chlamydophila abortus* in Costa Rican sheep flocks. *Open veterinary journal*, 5(2), 122-126.
- Villagra-Blanco, R., Esquivel-Suárez, A., Wagner, H., Romero-Zúñiga, J. J., Taubert, A., Wehrend, A., ... & Dolz, G. (2018). Seroprevalence and factors associated with *Toxoplasma gondii*-, *Neospora caninum*-and *Coxiella burnetii*-infections in dairy goat flocks from Costa Rica. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 14, 79-84.
- Villagra-Blanco, R., Barrantes-Granados, O., Montero-Caballero, D., Romero-Zúñiga, J. J., & Dolz, G. (2019). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections and associated factors in sheep from Costa Rica. *Parasite epidemiology and control*, 4, e00085.
- Vogelsang, E. G., & Gallo, P. (1941). *Globidium besnoiti* (Marotel, 1912) y habronemosis cutánea en bovinos de Venezuela. *Rev. Med. Vet. Parasitol. Caracas*, 3, 153-155.
- Weber, F. H., Jackson, J. A., Sobecki, B., Choromanski, L., Olsen, M., Meinert, T., ... & Ellis, J. T. (2013). On the efficacy and safety of vaccination with live tachyzoites of *Neospora caninum* for prevention of neospora-associated fetal loss in cattle. *Clin. Vaccine Immunol.*, 20(1), 99-105.
- Wheelhouse, N., Aitchison, K., Laroucau, K., Thomson, J., & Longbottom, D. (2010). Evidence of *Chlamydophila abortus* vaccine strain 1B as a possible cause of ovine enzootic abortion. *Vaccine*, 28(35), 5657-5663.
- Zhang, G. Q., Nguyen, S. V., To, H., Ogawa, M., Hotta, A., Yamaguchi, T., ... & Hirai, K. (1998). Clinical evaluation of a new PCR assay for detection of *Coxiella burnetii* in human serum samples. *Journal of clinical microbiology*, 36(1), 77-80.

ARTÍCULO I

Determinación de valores predictivos de las pruebas inmunoenzimáticas indirectas para *Besnoitia besnoiti*, *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii* en bovinos de la zona Huetar Norte de Costa Rica

Resumen

En el presente trabajo se investigaron tres protozoarios intracelulares obligados, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* y *Besnoitia besnoiti*, que han sido asociados con problemas reproductivos en bovinos, ocasionando pérdidas económicas en las fincas. El diagnóstico de estos apicomplexa se basa sobre todo en técnicas serológicas, ya que permiten detectar de forma rápida, tanto infecciones activas como infecciones crónicas. El objetivo del estudio fue determinar la presencia serológica de *T. gondii* y *N. caninum* en bovinos de la Región Huetar Norte de Costa Rica, establecer coexposiciones y determinar los valores predictivos de tres inmunoensayos indirectos (*T. gondii*, *N. caninum* y *B. besnoiti*) utilizando el Teorema de Bayes. Se seleccionaron un total de 327 bovinos (164 seropositivos y 163 seronegativos para *B. besnoiti*) de un banco de sueros, recolectado en 40 fincas de leche y doble propósito de la Región Huetar Norte, los cuales se analizaron mediante inmunoensayos para *T. gondii* y *N. caninum*. Para *T. gondii* se determinaron prevalencias globales y a nivel de finca de 30,5% y 67,5%, para *N. caninum* de 18,0% y 75,0%, respectivamente. Además, se hallaron 42 (12,8%) animales con infecciones *T. gondii* y *B. besnoiti*, 39 (11,9%) bovinos con infecciones *N. caninum* y *B. besnoiti* y 11 (3,3%) animales con infecciones *T. gondii* y *N. caninum*. Siete animales (2,1%) presentaron infecciones con los tres agentes. Se determinó un valor predictivo positivo de 91,4%, 64,7%, 100,0% y un valor predictivo negativo de 98,5%, 100,0% y 99,0% para los ELISA de *T. gondii*, *N. caninum* y *B. besnoiti*, respectivamente. Se concluye, que las técnicas serológicas mostraron un buen desempeño, y que existen bajas posibilidades de resultados falsos positivos o negativos, con excepción del ensayo de *N. caninum*. Los resultados confirman además la circulación de *T. gondii*, *N. caninum* y *B. besnoiti* en los hatos bovinos de la Región Huetar Norte. Se recomienda alertar a productores y médicos veterinarios sobre la presencia de estos parásitos, así como sobre la

posibilidad de infecciones concomitantes de dos y hasta tres apicomplexa en fincas de la zona Huetar Norte. Se recomienda implementar programas de educación y control para reducir la toxoplasmosis, una enfermedad zoonótica y desatendida, de los hatos bovinos de Costa Rica.

Palabras claves

inmunoensayo indirecto, sensibilidad, especificidad, valores predictivos, coexposiciones, zoonosis

Abstract

In the present work, three obligate intracellular protozoa, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Besnoitia besnoiti*, which have been associated with reproductive problems in cattle, causing economic losses in farms, were investigated. The diagnosis of these apicomplexa is based above all on serological techniques, since they allow rapid detection of both active infections and chronic infections. The objective of the study was to determine the serological presence of *T. gondii* and *N. caninum* in cattle from the North Huetar Region of Costa Rica, establish co-infections and determine the predictive values of three indirect immunoassays (*T. gondii*, *N. caninum* and *B. besnoiti*) using Bayes' Theorem. A total of 327 bovines (164 seropositive and 163 seronegative for *B. besnoiti*) were selected from a serum bank, collected from 40 dairy and dual-purpose farms in the North Huetar Region, which were analyzed by immunoassays for *T. gondii* and *N. caninum*. For *T. gondii*, global and farm-level prevalences of 30.5% and 67.5% were determined, for *N. caninum* of 18.0% and 75.0%, respectively. In addition, 42 (12.8%) animals with *T. gondii* and *B. besnoiti* infections were found, 39 (11.9%) cattle with *N. caninum* and *B. besnoiti* infections and 11 (3.3%) animals with *T. gondii* and *B. besnoiti* infections. Seven animals (2.1%) presented infections with the three agents. A positive predictive value of 91.4%, 64.7%, 100.0% and a negative predictive value of 98.5%, 100.0% and 99.0% were determined for the ELISAs of *T. gondii*, *N. caninum* and *B. besnoiti*, respectively. It is concluded that the serological techniques showed a good performance, and that there are low possibilities of false positive or negative results, except for the *N. caninum* test. The results also confirm the circulation of *T. gondii*, *N. caninum* and *B. besnoiti* in cattle herds in the North Huetar

Region. It is recommended to alert producers and veterinarians about the presence of these parasites, as well as about the possibility of concomitant infections of two and up to three apicomplexa in farms in the Huetar Norte area. It is recommended to implement education and control programs to reduce toxoplasmosis, a zoonotic and neglected disease, in cattle herds in Costa Rica.

Keywords

Indirect immunoassay, sensitivity, specificity, predictive values, coinfections, zoonosis.

1. Introducción

Toxoplasma gondii, *Neospora caninum* y *Besnoitia besnoiti* son protozoarios del filo Apicomplexa y familia Sarcocystidae. Estos parásitos han sido asociados con diversas enfermedades respiratorias, nerviosas, cardíacas, y principalmente con problemas reproductivos en bovinos, ocasionando pérdidas económicas en las fincas (Gazzones *et al.*, 2019; Villagra-Blanco *et al.*, 2019). Los tres protozoarios son patógenos intracelulares obligados y generan quistes en los tejidos bovinos, por los cuales tienen tropismo: *T. gondii* en músculos y sistema nervioso central (SNC), *N. caninum* en músculos, SNC, útero y tejidos fetales, mientras que *B. besnoiti* genera quistes cutáneos (Hemphill *et al.*, 2017).

La toxoplasmosis se reportó por primera vez en 1908 (Dubey *et al.*, 2009), la besnoitiosis en 1916 (Franco & Borges, 1916), y la neosporosis en 1988 (Dubey *et al.*, 1988). Los ooquistes de *T. gondii* y *N. caninum* son eliminados en las heces de felinos y caninos, respectivamente. La infección de los rumiantes ocurre a través de la ingestión de ooquistes infectivos en pasturas, alimentos o fuentes de agua (Dubey *et al.*, 2002; Dubey, 2003; Jacquet *et al.*, 2010), los cuales migran a la musculatura en donde se enquistan. En el momento de la preñez se activa el parásito y migra, ubicándose en la placenta o eventualmente en el feto, ocasionando reabsorciones, malformaciones, abortos, momificaciones, natimuertos, neonatos débiles con síntomas neurológicos o neonatos asintomáticos (Dubey, 2009). Los parásitos se transmiten además en forma transplacentaria de la madre al feto, y *T. gondii* a las personas (zoonosis) (Silva *et al.*, 2002; Dubey *et al.*, 2009). La besnoitiosis se transmite mediante insectos chupadores de sangre (vectores

mecánicos), ocasionando inicialmente fiebre y síntomas inespecíficos, hasta producir edemas e hiperqueratosis, emaciación, baja productividad, abortos e infertilidad en la fase crónica (Jacquiet *et al.*, 2010).

El diagnóstico de estos apicomplexa se basa sobre todo en técnicas serológicas, ya que permiten detectar de forma rápida, tanto las infecciones activas como infecciones latentes o crónicas, para tomar medidas preventivas y correctivas (García-Lunar *et al.*, 2013). Estudios mediante la técnica de inmunoblot establecieron, que los anticuerpos contra *B. besnoiti* reconocen los diez antígenos presentes en los taquizoitos y bradizoítos de *B. besnoiti*, pero no los antígenos de *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis cruzi*, *Sarcocystis hominis* o *Sarcocystis hirsuta*, estableciéndose pocas reacciones cruzadas entre *B. besnoiti* y apicomplexa relacionados (Schaes *et al.*, 2010). En contraste, un estudio realizado por García-Lunar *et al.* (2013) determinó reacciones falsas positivas en una prueba de inmunoensayo enzimático (ELISA) comercial para *B. besnoiti*, lo cual se asoció a la presencia de anticuerpos contra *N. caninum* y *Sarcocystis* spp., por lo cual se recomendó la validación de resultados serológicos de besnoitiosis bovina mediante el análisis de la presencia de anticuerpos contra agentes apicomplexa, para descartar reacciones falsas positivas. Finalmente, García-Lunar *et al.* (2015) investigaron las reacciones cruzadas en el diagnóstico serológico de infecciones apicomplexa utilizando sueros de animales infectados experimentalmente. Se establecieron reacciones cruzadas en particular en las pruebas de inmunofluorescencia (IFAT) del laboratorio SALUVET de España y el ELISA INGEZIM BES 12.BES.K1 del laboratorio INGENASA de España, en ambos casos entre *B. besnoiti* y *N. caninum*. No así, en las demás pruebas analizadas: ELISA de PrioCHECK (Holanda), ELISA de IDVET (Francia) y otros IFATs y Western Blots desarrollados tanto por la Universidad Complutense de Madrid (España), así como por el Instituto de Investigación Federal Friedrich-Loeffler en Greifswald, Insel Riems, Alemania.

En Costa Rica se ha estudiado sobre todo la epidemiología de la neosporosis bovina. Pérez *et al.* (1998) reportaron por primera vez la presencia del parásito en bovinos y su asociación con abortos mediante el análisis histopatológico de fetos abortados y serología (ELISA e IFAT), mientras que Romero *et al.* (2002) encontraron un 39,7% (1191/3002) de seropositividad (ELISA) en fincas lecheras de Poás de Alajuela, además, determinaron que *N. caninum* se transmitía en los hatos sobre todo en forma vertical. En contraste, solamente

existe un estudio sobre *T. gondii* en bovinos (Arias *et al.*, 1994), que encontró una seroprevalencia de 34.4% (n=601) a nivel nacional, utilizando la técnica de inmunofluorescencia indirecta. En un banco de sueros recolectado en 2017, de animales que habían abortado, pero que habían resultado seronegativos a brucelosis y neosporosis, se detectó por primera vez en el país una seropositividad de 31.5% de *B. besnoiti* mediante ELISA (Fallas-Elizondo *et al.*, 2017). Con el fin de confirmar la presencia de un nuevo agente del grupo de los apicomplexa en el país, así como para descartar de que se traten de resultados falsos positivos, se analizó mediante inmunoensayos comerciales la presencia de anticuerpos contra *T. gondii*, *N. caninum* y *B. besnoiti* en sueros bovinos y se establecieron los valores predictivos, además, se determinó la presencia serológica de *T. gondii* y *N. caninum* en la Región Huetar Norte de Costa Rica.

2. Metodología

2.1. Tipo de estudio y población a estudiar

Se realizó un estudio observacional transversal descriptivo, para establecer los valores predictivos y las correlaciones entre las pruebas de ELISA para *T. gondii*, *N. caninum* y *B. besnoiti*, además se determinó la presencia serológica de *T. gondii* y *N. caninum* en la región Huetar Norte de Costa Rica. La zona se eligió por la gran población bovina presente (428844 cabezas de ganado) representando el 33,5% del total de los bovinos del país (1278817 reses) (INEC, 2014). Con el objetivo de aumentar la probabilidad de tener muestras seropositivas, se utilizó la fórmula de cálculo de Canon & Roe (1980), buscando detectar una prevalencia mínima de un 1%, con un nivel de confianza del 95%, en una población de 428844 bovinos. El número mínimo requerido de animales a muestrear fue de 299; sin embargo, se analizaron 327 muestras. El cálculo del tamaño de muestra se realizó con el software WinEpi (Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, España).

Los sueros para este estudio se tomaron de un banco de sueros bovinos (n=600). Estos sueros provenían de 40 fincas de leche y doble propósito de la Cooperativa Dos Pinos, ubicadas en Aguas Zarcas (6), Fortuna (3), Monterrey (2), Muelle (3), Venecia (4), Zarcero (13) y Ciudad Quesada (9) de la Región Huetar Norte de Costa Rica. De estos se seleccionaron 327 sueros, 164 seropositivos y 163 seronegativos a *B. besnoiti*, los cuales

habían sido analizados previamente con el ID Screen® Besnoitia Indirect 2.0 (97.2% sensibilidad (Se) y 100% especificidad (Sp)) de la compañía IDVet, Montpellier, Francia (Lenfant, 2013) y de los cuales se conocían los valores S/P (ratio de muestra/positivo, por sus siglas en inglés “sample/positive”).

2.2. Diagnóstico serológico

Para la detección de anticuerpos contra *T. gondii* y *N. caninum* se utilizaron los siguientes ELISA indirectos de la compañía IDVet (Montpellier, Francia): ID Screen® Toxoplasmosis Indirect Multi-species (96.7% Se y 96% Sp) (Mangili *et al.*, 2011) y ID Screen® *Neospora caninum* Indirect (100% Se y 88% Sp) (Alvarez-García *et al.*, 2013).

La realización de los ELISA se hizo de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Previamente se prepararon los sueros en placas de 96 pocillos, esto para evitar diferencias en los tiempos de incubación entre las muestras. Se sacaron los reactivos del refrigerador donde estaban almacenados a 5°C, y se dejó que todos los reactivos alcanzaran la temperatura ambiente en el laboratorio (21°C), y se procedió a preparar la solución de lavado, diluyendo 1 parte en 20 de agua destilada.

El análisis de los sueros se realizó de la siguiente manera: primero se agregó 90µl del buffer de dilución a cada pocillo de las placas previamente sensibilizadas con el antígeno. En las posiciones A1 y B1 se agregaron 10µl del control negativo y en las posiciones C1 y D1 se agregaron 10µl del control positivo, y en los demás pocillos 10µl de suero bovino a analizar. Los sueros se incubaron por 45 minutos a temperatura ambiente, después se vaciaron los pocillos y se realizaron 3 lavados, con 300µl de la solución de lavado. Luego se preparó el conjugado diluyendo 1:10 con buffer de dilución, se agregó 100µl a cada pocito y se dejó incubar 30 minutos a temperatura ambiente, para luego volver a realizar 3 lavados. Finalmente se agregó 100µl de la solución de sustrato, se dejó incubando 15 minutos en la oscuridad y se detuvo la reacción con 100µl de solución de parada en cada pocito. Por último, las placas se llevaron al lector de ELISA Multiskan EX de Thermo Labsystems®, en el cual se realizó la lectura de las densidades ópticas (DO) a 450nm. Para la validación de las pruebas, la Densidad Óptica (DO) de los controles positivos debía ser >0.350, y el cociente de la media de las DO de los controles positivos entre la media de la DO de los controles negativos >3. Luego se procedió a calcular el porcentaje S/P utilizando la siguiente fórmula: $(OD \text{ muestra} - OD \text{ control negativo} / OD \text{ control positivo} - OD \text{ control negativo}) \times 100$. Sueros

que arrojaron S/P $\leq 40\%$ se consideraron negativos, entre 40%-50% dudosos o positivos débiles y $\geq 50\%$ positivos.

2.3. Análisis de datos

Una vez obtenidos los resultados de los sueros en las pruebas de ELISA, se calculó el valor predictivo de las pruebas (VPP y VPN) utilizando las siguientes fórmulas del Teorema de Bayes (Tarabla & Signorini, 2013):

$$\text{VPP} = \frac{\text{Prevalencia} \times \text{Sensibilidad}}{\text{Prevalencia} \times \text{Sensibilidad} + (1 - \text{Prevalencia}) \times (1 - \text{Especificidad})}$$

$$\text{VPN} = \frac{(1 - \text{Prevalencia}) \times \text{Especificidad}}{(1 - \text{Prevalencia}) \times \text{Especificidad} + \text{Prevalencia} \times (1 - \text{Sensibilidad})}$$

Para el cálculo se utilizaron la sensibilidad y especificidad reportada para cada una de las pruebas inmunoenzimáticas, y la prevalencia de *T. gondii* y *N. caninum* obtenida con los 327 bovinos, mientras que para *B. besnoiti* se utilizó la seroprevalencia determinada con 600 sueros (27,3%). Los valores predictivos cercanos al 100% se consideraron “altos”, cercanos al 50% “intermedios” y cercanos al 0% “bajos” (Bravo-Grau *et al.*, 2015). Posteriormente se calculó la prevalencia aparente, que consiste en la suma de los verdaderos positivos más los falsos positivos.

Se estableció la presencia serológica de *T. gondii* y *N. caninum* en la zona Huetar Norte de Costa Rica y se realizaron correlaciones entre las pruebas, con resultados positivos por pares (*B. besnoiti* y *N. caninum*, *B. besnoiti* y *T. gondii*, *N. caninum* y *T. gondii*) y para las tres enfermedades para establecer coexposiciones.

3. Resultados

Del total de 327 sueros analizados, 100 y 59 resultaron positivos a *T. gondii* y *N. caninum*, respectivamente. Se estableció VPP altos para el ELISA de *T. gondii* y *B. besnoiti*, así como un VPP intermedio para *N. caninum*. Los VPN determinados para los tres agentes fueron altos (Cuadro 1). En el caso de la prueba de *T. gondii* se establecieron un 2,7% (n=9) de resultados falsos positivos y 0,9% (n=3) de resultados falsos negativos, con *N. caninum*

9,7% (n=32) resultados falsos positivos y ningún resultado falso negativo, y con *B. besnoiti* ningún resultado falso positivo y 0,8% (n=2) resultados falsos negativos. Además, la prevalencia aparente varió en el caso de *N. caninum* y *T. gondii*, pero no así en el caso de *B. besnoiti*. Las prevalencias ajustadas (resta de los falsos positivos de los verdaderos positivos) para *T. gondii*, para *N. caninum* y para *B. besnoiti* se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Determinación de las prevalencias, VPP, VPN, falsos positivos, falsos negativos, prevalencias aparentes y ajustadas a partir de los resultados serológicos de ELISA IDVET® para *Toxoplasma gondii*, *Nespora caninum* y *Besnoitia besnoiti* en bovinos de la Zona Huetar Norte de Costa Rica, 2018

| Parámetro | <i>T. gondii</i> n=327 | <i>N. caninum</i> n=327 | <i>B. besnoiti</i> n=600 |
|---------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Prevalencia (%) | 30,5 | 18,0 | 27,3 |
| VPP (%) | 91,4 | 64,7 | 100,0 |
| VPN (%) | 98,5 | 100 | 99,0 |
| Falsos positivos (%) | 2,7 | 9,7 | 0,0 |
| Falsos negativos (%) | 0,9 | 0,0 | 0,8 |
| Prevalencia aparente (%) | 32,4 | 27,8 | 27,3 |
| Prevalencia ajustada (%) | 27,9 | 11,6 | 27,3 |

Se determinó un porcentaje de muestras seropositivas global mayor de *T. gondii* (30,5%) que de *N. caninum* (18,0%), sin embargo, *N. caninum* (75,0%) parece estar más ampliamente distribuido en las fincas que *T. gondii* (67,5%) (Cuadros 2 y 3).

Cuadro 2. Porcentaje de muestras seropositivas a *T. gondii* y *N. caninum* en bovinos de siete cantones de la zona Huetar Norte de Costa Rica

| Cantón | <i>T. gondii</i> % (+/total) | <i>N. caninum</i> % (+/total) |
|----------------|--|---|
| Aguas Zarcas | 34,4% (20/58) | 24,1% (14/58) |
| Ciudad Quesada | 10,7% (3/28) | 7,1% (2/28) |
| Fortuna | 31,1% (14/45) | 15,5% (7/45) |
| Monterrey | 23,3% (7/30) | 3,3% (1/30) |
| Muelle | 20,0% (1/5) | 60,0% (3/5) |
| Venecia | 22,7% (5/22) | 31,8% (7/22) |
| Zarcero | 35,9% (50/139) | 17,9% (25/139) |
| Total | 30,5% (100/327) | 18,0% (59/327) |

Cuadro 3. Porcentaje de muestras seropositivas a *T. gondii* y *N. caninum* en fincas de siete cantones de la zona Huetar Norte de Costa Rica

| Cantón | <i>T. gondii</i> % (+/total) | <i>N. caninum</i> % (+/total) |
|----------------|---|--|
| Aguas Zarcas | 100,0% (6/6) | 100,0% (6/6) |
| Ciudad Quesada | 33,3% (3/9) | 100,0% (2/2) |
| Fortuna | 100,0% (3/3) | 100,0% (3/3) |
| Monterrey | 100,0% (2/2) | 50,0% (1/2) |
| Muelle | 33,3% (1/3) | 66,6% (2/3) |
| Venecia | 50,0% (2/4) | 100,0% (4/4) |
| Zarcelero | 76,9% (10/13) | 92,3% (12/13) |
| Total | 67,5% (27/40) | 75,0% (30/40) |

La coinfección más frecuente fue la de *T. gondii* con *B. besnoiti* (12,8%, 42/327), seguido de *N. caninum* con *B. besnoiti* (11,9%, 39/327) y *T. gondii* con *N. caninum* (3,3%, n=11/327). En un 2,1% de los casos (n=7/327) se encontraron casos positivos para los tres agentes.

4. Discusión

Los hallazgos del presente estudio concuerdan con lo reportado por García-Lunar *et al.* (2017), que las pruebas serológicas de IDVET® presentan un excelente desempeño en el diagnóstico de parásitos apicomplexa. Para determinar el desempeño de la sensibilidad y especificidad de las técnicas serológicas, generalmente se utilizan análisis de puntos de corte, que utiliza la media y dos o tres desviaciones estándar (Gutiérrez *et al.*, 1994; Lenfant, 2013; Mangili *et al.*, 2009; Alvarez-García *et al.*, 2013). En el presente caso se determinó los valores predictivos mediante un metaanálisis, que permite determinar el desempeño de las técnicas. En la literatura no se encontraron valores predictivos de las pruebas de ELISA utilizadas, de modo que este trabajo reporta por primera vez estos datos.

Los altos VPP determinados para los inmunoensayos de *T. gondii* (91,4%) y *B. besnoiti* (100%), indican un buen desempeño de ambas pruebas para detectar verdaderos positivos (Arias *et al.*, 1994).

En contraste, con el ELISA de *N. caninum*, se obtuvo un valor de VPP intermedio (64,7%), debido a la baja especificidad (88%) y baja positividad (18%) establecida. Estos resultados (ninguna reacción falsa positiva con *B. besnoiti*, 2.7% con *T. gondii* y 9.7% con *N. caninum*) son importantes tomar en cuenta por veterinarios y productores, cuando se toman decisiones de descartar animales en base a resultados serológicos, ya que se podrían estar descartando animales sanos, afectando la productividad de la finca por un problema de baja especificidad de una prueba diagnóstica (Awinda *et al.*, 2013).

Las tres pruebas mostraron altos VPN (*T. gondii* 98,5%, *B. besnoiti* 99% y *N. caninum* 100%), indicando que solamente en menos de 1.5% de los casos pueden ocurrir reacciones falsas negativas, lo que concuerda con Bravo-Grau & Cruz (2015), que encontraron VPN altos cuando las prevalencias son bajas. A pesar de que es baja la probabilidad de obtener resultados falsos negativos con los ELISA, es importante considerarlos, ya que estos parásitos apicomplexa ocasionan infecciones persistentes, y animales infectados pueden pasar los parásitos a su progenie y perpetuarse así en los hatos, además pueden ser transmitidos a otros animales a través de vectores (artrópodos) como en el caso de *Besnoitia* (Alvarez-Garcia *et al.*, 2014). Los VPP y VPN ofrecen más valor a los resultados obtenidos y reafirma su validez para ser utilizadas en estudios epidemiológicos.

Se reporta por primera vez la seropositividad de *T. gondii* (30,6%) y *N. caninum* (18,0%) en la zona Huetar Norte. Estudios previos habían reportado prevalencias de *N. caninum* de 39,7% en fincas de la zona de Poás de Alajuela (Romero *et al.*, 2002) y de un 34.4% para *T. gondii* a nivel nacional (Arias *et al.*, 1994). En el caso de *N. caninum*, la prevalencia fue más baja que la reportada por Romero *et al.* (2002), probablemente por el bajo número de animales muestreados por hato o porque en los últimos 20 años se han realizado charlas sobre la enfermedad, de modo que los veterinarios y productores han tomado conciencia de solicitar el diagnóstico de neosporosis en caso de abortos (Romero *et al.*, 2005).

La prevalencia de *T. gondii* es similar a la reportada en 1994, esto se puede deber a que no es diagnosticada regularmente (como si lo es *N. caninum*). Sin embargo, se considera importante alertar a veterinarios y productores, porque además de que puede estar ocasionando pérdidas económicas en los hatos por abortos (Stelzer *et al.*, 2019) es un agente

zoonótico, y pareciera que actualmente desatendido en la producción pecuaria (Stelzer *et al*, 2019).

Se estableció un buen desempeño de los ELISA y se confirmó la presencia serológica de los tres agentes apicomplexa en hatos bovinos de la Región Huetar Norte de Costa Rica. Se recomienda realizar estudios sobre el impacto que tienen estos agentes en la producción bovina de esta región, en infecciones sencillas o concomitantes, además implementar programas de educación y control para lograr reducir la toxoplasmosis de hatos bovinos.

5. Conclusiones

- Los VPP determinados para las pruebas fueron para *T. gondii* 91,4%, *N. caninum* 64,7%, y *B. besnoiti* 100%.
- Las tres pruebas mostraron VPN altos (*T. gondii* 98,5%, *N. caninum* 100%, y *B. besnoiti* 99,0%).
- Se determinó la seroprevalencia global y a nivel de fincas para *T. gondii* (30,5% y 67,5%) en la zona Huetar Norte de Costa Rica.
- Se determinó una prevalencia global de *N. caninum* de 18,0% con una prevalencia a nivel de fincas de 75,0% en la zona Huetar Norte de Costa Rica.
- Se determinó coexposiciones de *B. besnoiti* y *T. gondii* en un 12,8% de los casos, *B. besnoiti* y *N. caninum* en un 11,9% y *T. gondii* y *N. caninum* en un 3,3% de los casos.
- Los resultados confirman la circulación de *T. gondii*, *N. caninum* y *B. besnoiti* en los hatos bovinos de la zona norte.

6. Recomendaciones

- Informar a los productores y personal médico veterinario de la Región Huetar Norte sobre la presencia y circulación de los tres agentes apicomplexa en hatos bovinos.
- Implementar programas de educación y control de la toxoplasmosis en el hato bovino, para controlar esta enfermedad zoonótica y desatendida en Costa Rica
- Estudiar el impacto que tienen estos apicomplexa en el hato bovino de la región Huetar Norte (infecciones sencillas o concomitantes).

7. Referencias bibliográficas

- Alvarez-García, G., García-Culebras, A., Gutiérrez-Expósito, D., Navarro-Lozano, V., Pastor-Fernández, I., & Ortega-Mora, L. M. (2013). Serological diagnosis of bovine neosporosis: a comparative study of commercially available ELISA tests. *Veterinary parasitology*, 198(1-2), 85-95.
- Alvarez-Garcia, G., Garcia-Lunar, P., Gutierrez-Exposito, D., Shkap, V., & Ortega-Mora, L. M. (2014). Dynamics of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle. *Parasitology*, 141(11), 1419-1435.
- Arias, M. L., Reyes, L., Chinchilla, M., & Linde, E. (1994). Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa) in meat producing animals in Costa Rica. *Revista de biología tropical*, 15-20.
- Awinda, P. O., Mealey, R. H., Williams, L. B., Conrad, P. A., Packham, A. E., Reif, K. E., ... & Ueti, M. W. (2013). Serum antibodies from a subset of horses positive for *Babesia caballi* by competitive ELISA demonstrate a protein recognition pattern not consistent with infection. *Clinical and Vaccine Immunology*, CVI-00479.
- Bravo-Grau, S., & Cruz, J. P. (2015). Estudios de exactitud diagnóstica: Herramientas para su Interpretación. *Revista chilena de radiología*, 21(4), 158-164.
- Cortes, H., Leitao, A., Gottstein, B., & Hemphill, A. (2014). A review on bovine besnoitiosis: a disease with economic impact in herd health management, caused by *Besnoitia besnoiti* (Franco and Borges, 1916). *Parasitology*, 141(11), 1406-1417.
- Dubey, J. P., Carpenter, J. L., Speer, C. A., Topper, M. J., & Uggla, A. N. D. A. (1988). Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 192(9), 1269-1285.
- Dubey, J. P., Barr, B. C., Barta, J. R., Bjerkås, I., Björkman, C., Blagburn, B. L., ... & Lindsay, D. S. (2002). Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *International journal for parasitology*, 32(8), 929-946.
- Dubey, J. P. (2003). Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean journal of parasitology*, 41(1), 1.

- Dubey, J. P. (2009). History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology*, 39(8), 877-882.
- Enachescu, V., Ionita, M., & Mitrea, I. (2014). Comparative study for the detection of antibodies to *Neospora caninum* in milk and sera in dairy cattle in southern Romania. *Acta parasitologica*, 59(1), 5-10.
- Fallas-Elizondo, D., Chacón-Calderón, J., Romero-Zúñiga, J.J., Dolz, G. (2017). Presencia serológica de *Besnoitia besnoiti*, *Toxoplasma gondii*, *Coxiella burnetii* y *Chlamydia abortus* en hatos bovinos de Costa Rica. En: XXII Congreso Nacional de Medicina Veterinaria, San José, Costa Rica, Noviembre 2017.
- Fitzpatrick, J. L. (2013). Global food security: the impact of veterinary parasites and parasitologists. *Veterinary parasitology*, 195(3-4), 233-248.
- Franco, E. E. and Borges, I. (1916). Sur la sarcosporidiose Bovine. *Arquivos do Instituto Bacteriologico Câmara Pestana* 4, 269–289.
- García-Lunar, P., Ortega-Mora, L. M., Schares, G., Gollnick, N. S., Jacquiet, P., Grisez, C., ... & Álvarez-García, G. (2013). An Inter-Laboratory Comparative Study of Serological Tools Employed in the Diagnosis of *Besnoitia besnoiti* Infection in Bovines. *Transboundary and emerging diseases*, 60(1), 59-68.
- García-Lunar, P., Moré, G., Campero, L., Ortega-Mora, L. M., & Álvarez-García, G. (2015). Anti-*Neospora caninum* and anti-*Sarcocystis* spp. specific antibodies cross-react with *Besnoitia besnoiti* and influence the serological diagnosis of bovine besnoitiosis. *Veterinary Parasitology*, 214(1-2), 49-54.
- Gazzonis, A., Villa, L., Manfredi, M., & Zanzani, S. (2019). Spatial analysis of infections by *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) in small ruminants in Northern Italy. *Animals*, 9(11), 916.
- Georgieva, D. A., Prelezov, P. N., & Koinarski, V. T. S. (2006). *Neospora caninum* and neosporosis in animals. A review. *Bulg J Vet Med*, 9(1), 1-26.
- Hemphill, A., Leitão, A., Ortega-Mora, L. M., & Cooke, B. M. (2017). ApiCOWplexa 2017-4th International Meeting on Apicomplexan Parasites in Farm Animals. *International journal for parasitology*, 47(12), 697.

- Gondim, L. F., Mineo, J. R., & Schares, G. (2017). Importance of serological cross-reactivity among *Toxoplasma gondii*, *Hammondia* spp., *Neospora* spp., *Sarcocystis* spp. and *Besnoitia besnoiti*. *Parasitology*, 144(7), 851-868.
- Gutiérrez, A. F., Yamamoto-Kimura, L., Velasco, L. Y., Espinoza, J. G., & García, M. C. M. (1994). Utilidad de las curvas de sensibilidad y especificidad conjunta en la aplicación de una prueba de diagnóstico. *Salud Pública de México*, 36(3), 311-317.
- Hill, D., & Dubey, J. P. (2002). *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clinical microbiology and infection*, 8(10), 634-640.
- Hnasko, R., Lin, A., McGarvey, J. A., & Stanker, L. H. (2011). A rapid method to improve protein detection by indirect ELISA. *Biochemical and biophysical research communications*, 410(4), 726-731.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos (2014). Censo Agropecuario 2014. Resultados generales ganado vacuno. En línea: <http://www.inec.go.cr/censos/censo-agropecuario-2014>
- Jacquet, P., Liénard, E., & Franc, M. (2010). Bovine besnoitiosis: epidemiological and clinical aspects. *Veterinary parasitology*, 174(1), 30-36.
- Lenfant, F. (2013). Mise au point d'une technique de diagnostic sérologique par immunofluorescence indirecte de la Besnoitiose bovine à *Besnoitia besnoiti* (Doctoral dissertation).
- Mangili, P. M., Vesco, G., Feliziani, F., Paoloni, A., Menichelli, M., Cagiola, M., ... & Papa, P. (2009). Development and evaluation of the performance of an in-house ELISA to be used for the indirect diagnosis of Toxoplasmosis in sheep. *Proceeding of SIDILV, Parma (Italy)*.
- Ogawa, L., Freire, R. L., Vidotto, O., Gondim, L. F. P., & Navarro, I. T. (2005). Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from the northern region of the Paraná State, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 57(3), 312-316.
- Pérez, E., Gonzalez, O., Dolz, G., Morales, J. A., Barr, B., & Conrad, P. A. (1998). First report of bovine neosporosis in dairy cattle in Costa Rica. *Veterinary record*, 142(19), 520-521.

- Pita Fernández, S., & Pértegas Díaz, S. (2003). Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y especificidad. *Cad Aten Primaria*, 10(1), 120-124.
- Roqueplo, C., Halos, L., Cabre, O., & Davoust, B. (2011). *Toxoplasma gondii* in wild and domestic animals from New Caledonia. *Parasite*, 18(4), 345.
- Romero, J. J., Perez, E., Dolz, G., & Frankena, K. (2002). Factors associated with *Neospora caninum* serostatus in cattle of 20 specialised Costa Rican dairy herds. *Preventive veterinary medicine*, 53(4), 263-273.
- Romero, J. J., Van Breda, S., Vargas, B., Dolz, G., & Frankena, K. (2005). Effect of neosporosis on productive and reproductive performance of dairy cattle in Costa Rica. *Theriogenology*, 64(9), 1928-1939.
- Schares, G., Basso, W., Majzoub, M., Rostaher, A., Scharr, J. C., Langenmayer, M. C., ... & Gollnick, N. S. (2010). Comparative evaluation of immunofluorescent antibody and new immunoblot tests for the specific detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti* tachyzoites and bradyzoites in bovine sera. *Veterinary parasitology*, 171(1-2), 32-40.
- Silva, S., Chávez, A., Rivera, G., & Casas, E. (2002). Seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos lecheros del valle de Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 13(2), 51-55.
- Seltmann, A., Schares, G., Aschenborn, O. H., Heinrich, S. K., Thalwitzer, S., Wachter, B., & Czirják, G. Á. (2020). Species-specific differences in *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Besnoitia besnoiti* seroprevalence in Namibian wildlife. *Parasites & vectors*, 13(1), 1-12.
- Stelzer, S., Basso, W., Silván, J. B., Ortega-Mora, L. M., Maksimov, P., Gethmann, J., ... & Schares, G. (2019). *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis in farm animals: Risk factors and economic impact. *Food and Waterborne Parasitology*, 15, e00037.
- Tarabla, Héctor; Signorini, Marcelo (2013). *Epidemiología diagnóstica*. 1ra edición. Santa Fe Ediciones UNL. Santa Fe, Argentina.
- Villagra-Blanco, R., Barrantes-Granados, O., Montero-Caballero, D., Romero-Zúñiga, J. J., & Dolz, G. (2019). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections and associated factors in sheep from Costa Rica. *Parasite epidemiology and control*, 4, e00085.

Wallander, C., Frössling, J., Vågsholm, I., Uggla, A., & Lunden, A. (2015). *Toxoplasma gondii* seroprevalence in wild boars (*Sus scrofa*) in Sweden and evaluation of ELISA test performance. *Epidemiology & Infection*, 143(9), 1913-1921.

ARTÍCULO II

Seroprevalencia de *Besnoitia besnoiti*, *Coxiella burnetii* y *Chlamydia abortus* en hatos bovinos de la zona norte de Costa Rica

Resumen

Besnoitia besnoiti, *Coxiella burnetii* y *Chlamydia abortus* ocasionan enfermedad reproductiva en bovinos, mientras que los últimos dos se consideran además agentes zoonóticos. Hasta la fecha no se cuentan con reportes de prevalencia de *B. besnoiti* y *C. burnetii* en bovinos de Costa Rica. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la seroprevalencia y distribución de *B. besnoiti*, *C. burnetii* y *C. abortus* en fincas en la zona Huetar Norte de Costa Rica, así como detectar estos agentes mediante técnicas moleculares. Se realizó un estudio transversal descriptivo, en el que se analizaron 600 sueros de 40 fincas de bovinos de leche y doble propósito (15 sueros por finca). Las fincas seleccionadas se localizaron en los distritos de Aguas Zarcas (5), Ciudad Quesada (9), Fortuna (4), Monterrey (2), Muelle (3), Venecia (5) y Zarcero (12). El análisis serológico se realizó utilizando los ensayos de la compañía IDVET (Montpellier, Francia): IDScreen® *Besnoitia* Indirect 2.0 ELISA, IDScreen® Q Fever Indirect ELISA, e ID Screen® *Chlamydophila abortus* Indirect Multi-species ELISA. Además, se analizaron mediante técnicas moleculares 3 quistes cutáneos para *B. besnoiti*, 6 muestras de leche para *C. burnetii* y 4 hisopados vaginales para *C. abortus*. Las seroprevalencias determinadas para *B. besnoiti*, *C. burnetii* y *C. abortus* fueron 27,3%, 16,8% y 1,3%, respectivamente. Animales seropositivos a besnoitiosis se encontraron en todos los distritos analizados, menos en la Fortuna, pero sobre todo en Aguas Zarcas (64%), Venecia (36,6%) y Zarcero (33,3%). Los animales seropositivos a coxieliosis se encontraron también distribuidos en todos los distritos, sobre todo en Zarcero (24,6%), Ciudad Quesada (19,2%) y Aguas Zarcas (17,7%). Con respecto a *C. abortus*, se encontraron pocos animales seropositivos en tres distritos: Aguas Zarcas (3,3%), Monterrey (3,3%) y Ciudad Quesada (2,9%). Solamente se detectó coexistencia de *B. besnoiti* con *C. burnetii* en un total del 6,5% (n= 36) de animales infectados y en un 30,0% (n= 12) de fincas, que se ubicaron en Zarcero (n=10), Aguas Zarcas (n=1) y Ciudad Quesada (n= 1). Todos los análisis moleculares resultaron negativos. Se determinó por primera vez la presencia de anticuerpos

contra *B. besnoiti* y *C. burnetii* en bovinos de la región Huetar Norte de nuestro país. Se recomienda alertar a los productores, personal veterinario y a las autoridades oficiales sobre estos hallazgos, para tomar las medidas de prevención y control necesarias, en particular para *C. burnetii* por su potencial zoonótico. Se recomienda además realizar investigaciones para confirmar mediante aislamiento o diagnóstico molecular, la presencia de los agentes infecciosos en el país.

Palabras claves

inmunoensayo enzimático, reacción en cadena de la polimerasa, coexposiciones, zoonosis

Abstract

Besnoitia besnoiti, *Coxiella burnetii* and *Chlamydia abortus* cause reproductive disease in cattle, while the last two are also considered zoonotic agents. To date, there are no reports of the prevalence of *B. besnoiti* and *C. burnetii* in cattle in Costa Rica. The objective of this study was to determine the seroprevalence and distribution of *B. besnoiti*, *C. burnetii* and *C. abortus* on farms in the North Huetar zone of Costa Rica, as well as to detect these agents using molecular techniques. A descriptive cross-sectional study was carried out, in which 600 sera from 40 farms of dairy cattle and dual purpose (15 sera per farm) were analyzed. The selected farms were in the districts of Aguas Zarcas (5), Ciudad Quesada (9), Fortuna (4), Monterrey (2), Muelle (3), Venecia (5) and Zarcero (12). Serological analysis was performed using IDVET (Montpellier, France) assays: IDScreen® *Besnoitia* Indirect 2.0 ELISA, IDScreen® Q Fever Indirect ELISA, and ID Screen® *Chlamydomphila abortus* Indirect Multi-species ELISA. In addition, 3 skin cysts for *B. besnoiti*, 6 milk samples for *C. burnetii*, and 4 vaginal swabs for *C. abortus* were analyzed using molecular techniques. The seroprevalences determined for *B. besnoiti*, *C. burnetii* and *C. abortus* were 27.3%, 16.8% and 1.3%, respectively. Seropositive animals for besnoitiosis were found in all the districts analyzed, except in La Fortuna, but especially in Aguas Zarcas (64%), Venecia (36.6%) and Zarcero (33.3%). Coxeliosis seropositive animals were also found distributed in all districts, especially in Zarcero (24.6%), Ciudad Quesada (19.2%) and Aguas Zarcas (17.7%). Regarding *C. abortus*, few seropositive animals were found in three districts: Aguas Zarcas (3.3%), Monterrey (3.3%) and Ciudad Quesada (2.9%). Coinfections of *B. besnoiti* with *C.*

burnetii were only detected in a total of 6.5% (n= 36) of infected animals and in 30.0% (n= 12) of farms, which were in Zarcero (n =10), Aguas Zarcas (n=1) and Ciudad Quesada (n= 1). All molecular analyzes were negative. The presence of antibodies against *B. besnoiti* and *C. burnetii* in cattle from the Huetar Norte region of our country was determined for the first time. It is recommended to alert producers, veterinary personnel, and official authorities about these findings, to take the necessary prevention and control measures, particularly for *C. burnetii* due to its zoonotic potential. It is also recommended to carry out research to confirm, through isolation or molecular diagnosis, the presence of infectious agents in the country.

Keywords

indirect ELISA, S / P percentage, analysis of coinfections, molecular analysis, PCR

1. Introducción

Besnoitia besnoiti, *Coxiella burnetii* y *Chlamydia abortus* ocasionan enfermedad reproductiva en bovinos. *Besnoitia besnoiti* es un protozoo intracelular obligado del phylum Apicomplexa (Schaes *et al.*, 2009), mientras que *C. burnetii* y *C. abortus* son bacterias Gram negativas intracelulares obligadas (Jaton *et al.*, 2013; Bielawska-Drózd *et al.*, 2014; Salazar *et al.*, 2015).

La besnoitiosis ha sido reportada en África, Asia y América (Brasil y Canadá), y se considera una enfermedad emergente en Europa (Cortes *et al.*, 2014; Gutiérrez-Expósito *et al.*, 2012; Uzeda *et al.*, 2014). Este protozoo se transmite por insectos chupadores de sangre, como tábanos y moscas, y la enfermedad cursa con una fase aguda caracterizada por fiebre, fotofobia, descargas oculonasales y anorexia, seguida de una etapa crónica, con edemas e hiperqueratosis, por la presencia de quistes en la piel, ubre, testículos, fascias y órganos internos que ocasionan pérdida de peso, infertilidad, aborto y baja producción láctea (Jacquet *et al.*, 2010). La coxielosis y clamidiosis son zoonosis ampliamente distribuidas a nivel mundial (Longbottom & Coulter, 2003; Berri *et al.*, 2007; Damasceno *et al.*, 2018). Aunque son especies no relacionadas filogenéticamente, muestran algunas similitudes en su interacción con el huésped y la patogenia de la infección. Mientras *C. burnetii* se transmite a través de garrapatas duras y suaves (Duron *et al.*, 2015), *C. abortus* lo hace por contacto

directo con material contaminado como secreciones conjuntivales, genitales, uterinas, placentales y fetos abortados (Longbottom & Coulter, 2003). Las bacterias son muy resistentes y pueden sobrevivir por meses en el medio ambiente (Duron *et al.*, 2015; Longbottom & Coulter, 2003). En los animales provocan abortos, infertilidad, natimueertos, metritis, y placentitis (Longbottom & Coulter, 2003). Los tres agentes ocasionan infecciones persistentes en los bovinos, y en las personas *C. burnetii* es el agente etiológico de la Fiebre Q, que ocasiona en la etapa aguda fiebre y síntomas inespecíficos, y en la etapa crónica endocarditis y hepatitis que pueden ser letales (Van Shaik *et al.*, 2013; Kılıç *et al.*, 2016); mientras que *C. abortus* se ha reportado como causante de abortos en humanos (Longbottom & Coulter, 2003).

Las técnicas diagnósticas utilizadas son las directas o moleculares (Cortes *et al.*, 2007; Kirkan *et al.*, 2008; Campos-Hernández *et al.*, 2014), así como las indirectas o serológicas; las más frecuentemente utilizadas son el inmunoensayo enzimático (ELISA), la inmunofluorescencia indirecta (IFAT), el Western Blot y la fijación de complemento (García-Lunar *et al.*, 2012; O'Neill *et al.*, 2018). El diagnóstico de anticuerpos es la técnica de elección en bovinos para realizar monitoreos, programas de prevención e investigación, por la facilidad de la toma de la muestra, el costo de la prueba, y el análisis de muchos animales en poco tiempo (Slaba *et al.*, 2005; Sachse *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 2009; Czopowicz *et al.*, 2010; Díaz *et al.*, 2014; Agerholm *et al.*, 2013; García-Lunar *et al.*, 2013).

Los porcentajes de prevalencia de besnoitiosis han sido reportados en España (48,6%), Portugal (5,1%) e Italia (44,1%) (Zacarías, 2009). En América Latina se realizó únicamente un estudio de seroprevalencia en Brasil (3,4%), sin embargo, no se tienen datos de otros países del continente americano (Uzeda *et al.*, 2014). La seroprevalencia de *C. burnetii* ha sido reportada en muestras de leche en Estados Unidos (96,0%) y Grecia (95,0%), mediante la técnica IFAT en Brasil (23,8%) (Pearson *et al.*, 2014; Pexara *et al.*, 2018; Mioni *et al.*, 2020). Las prevalencias serológicas de *C. abortus* se han determinado en China (11,9%), en Bélgica (4,2%) y en México (4,9%) (Campos-Hernández *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2014). También se han realizado análisis moleculares para detectar los agentes, por ejemplo, para *B. besnoiti* la técnica fue implementada en Brasil, después de encontrar anticuerpos mediante la técnica de IFAT, sin embargo, no se logró detectar el agente mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), lo cual los autores

atribuyeron a la posible presencia de variantes antigénicas (Uzeda *et al.*, 2014). *Coxiella burnetii* ha sido reportado molecularmente en Latinoamérica en países como Argentina, Brasil y Cuba (Pacheco *et al.*, 2013; Mares-Guia *et al.*, 2014; Noda *et al.*, 2016), mientras que *C. abortus* ha sido detectada molecularmente en países como Algeria, Egipto y Brasil (Hireche *et al.*, 2017; Selim *et al.*, 2021; Silva-Zacarias *et al.*, 2009).

En un análisis preliminar realizado con un banco de 92 sueros recolectados en el año 2017, de bovinos que habían abortado y resultaron seronegativos a brucelosis y neosporosis, se determinó por primera vez la presencia serológica de *B. besnoiti* (31,5%), *C. burnetii* (36,9%) y *C. abortus* (58,6%) (Fallas *et al.*, 2017). El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la seroprevalencia y distribución de *B. besnoiti*, *C. burnetii* y *C. abortus* en fincas en la zona Huetar Norte de Costa Rica, así como detectar la presencia de los agentes mediante técnicas moleculares.

2. Metodología

2.1 Tipo y descripción del área de estudio

Se realizó un estudio transversal descriptivo para determinar la seroprevalencia de *B. besnoiti*, *C. burnetii* y *C. abortus* en bovinos de la zona Huetar Norte de Costa Rica. La zona se eligió por la gran población bovina presente (428844 cabezas de ganado), representando el 33,5% del total de los bovinos del país (1278817 reses) (INEC, 2014); además, por las temperaturas cálidas (24°C-30°C) y el régimen de lluvias de todo el año (IMN, 2008), que favorecen la presencia de los vectores y con eso la transmisión de los agentes.

2.2 Tipo, tamaño y toma de la muestra

El tamaño de la muestra a analizar fue de 600 bovinos, lo cual se calculó con la fórmula de Cannon y Rowe (1982), asumiendo una prevalencia intrahato de un 20% (Fallas *et al.*, 2017), un intervalo de confianza del 95% y un error esperado del 5%. Se seleccionaron 40 fincas al azar de una lista de 189 fincas de bovinos de leche y de doble propósito de la zona Huetar Norte. Las fincas seleccionadas se localizaron en los distritos de Aguas Zarcas (5), Ciudad Quesada (9), Fortuna (4), Monterrey (2), Muelle (3), Venecia (5) y Zarcero (12). En estas fincas se tomaron muestras de sangre de 15 animales adultos por finca, hasta completar la totalidad de animales requeridos (Figura 1). Las muestras de sangre se tomaron

con vacutainer y se remitieron al laboratorio por los médicos veterinarios de la Cooperativa Dos Pinos. En el laboratorio se centrifugaron por 10 minutos a 10000 g, se separó el suero y se guardó a -20°C hasta su análisis mediante ELISA.

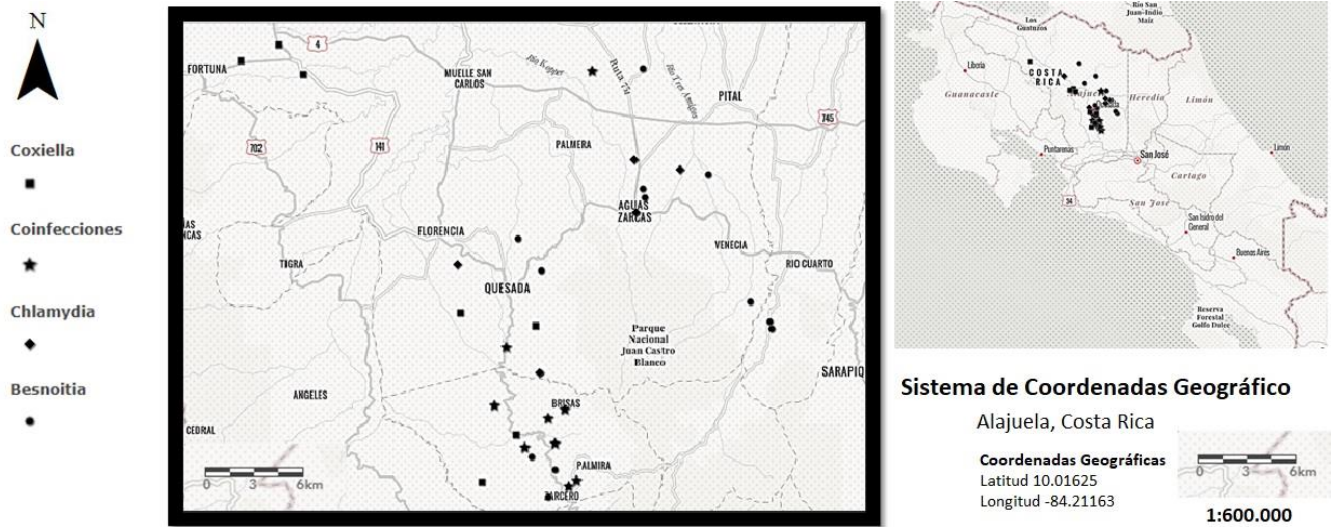


Figura 1. Ubicación geográfica y resultados serológicos de *B. besnoiti*, *C. burnetii* y *C. abortus* en 40 fincas bovinas de leche y de doble propósito analizadas en la zona Huetar Norte de la Provincia de Alajuela, Costa Rica, 2018.

2.3 Análisis serológico

El análisis serológico se realizó utilizando los siguientes ELISA indirectos de la compañía IDVET (Montpellier, Francia): IDScreen® Besnoitia Indirect 2.0 ELISA con una sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) reportada de 97.2% y 100%, respectivamente (García-Lunar *et al.*, 2013); IDScreen® Q Fever Indirect ELISA (100% Se y 100% Sp) (IDVET, 2016); y el ID Screen® *Chlamydophila abortus* Indirect Multi-species ELISA, (70.4% Se y 95.6% Sp) (Díaz *et al.*, 2014). Los ensayos se realizaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Primero, se dejó que todos los reactivos alcanzaran la temperatura ambiente, se colocaron los sueros a analizar en microplacas no sensibilizadas, con el fin de pasarlos con una micropipeta multicanal y evitar diferencias en los tiempos de incubación de las muestras, y se preparó la solución de lavado, diluyendo 1 parte de la solución concentrada en 20 partes de agua destilada. A las placas sensibilizadas con el antígeno se agregó 90µl del buffer de dilución a cada pocillo, se colocaron 10µl de cada suero a analizar y 10µl del suero control

positivo y negativo por duplicado. Para las pruebas de *B. besnoiti* y *C. burnetii* se incubaron los sueros por 45 minutos a temperatura ambiente, y para *C. abortus* 30 minutos a temperatura ambiente. Después de realizar 3 lavados se diluyó el conjugado 1:10 con el buffer de dilución, se agregó 100µl a cada pocillo y se dejó incubando 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron otros 3 lavados y se agregaron 100µl de la solución de sustrato a todos los pocillos, se dejó incubando 15 minutos en la oscuridad y se detuvo la reacción con 100µl de solución de parada. Por último, se llevaron las placas al lector de ELISA Multiskan EX de Thermo Labsystems®, en el cual se realizó la lectura de las densidades ópticas (DO) a 450nm. Para considerar válidos los ensayos, las densidades ópticas (DO) de los sueros controles positivos debían de resultar >0.350, y el cociente de la media de la DO de los controles positivos y la media de la DO de los controles negativos >3. El porcentaje S/P de los sueros para besnoitiosis y clamidiosis se calculó con la siguiente fórmula: $(DO \text{ muestra} / DO \text{ control positivo}) \times 100$. Para *B. besnoiti* los sueros con S/P $\leq 25\%$ se consideraron negativas, entre $>25\%$ y $<30\%$ positivos débiles, y $\geq 30\%$ positivos fuertes. Para *C. abortus* los sueros con S/P $\leq 50\%$ se consideraron negativos, $>50\%$ y $<60\%$ positivos débiles (+), $\geq 60\%$ y $\leq 70\%$ positivos medios (++) y $>70\%$ positivos fuertes (+++). Para la coxielosis se utilizó la siguiente fórmula: $[(DO \text{ muestra} - DO \text{ control negativo}) / (DO \text{ control positivo} - DO \text{ control negativo})] \times 100$. Sueros que arrojaron S/P $\leq 40\%$ se consideraron negativos, $>40\%$ y $\leq 50\%$ positivos débiles (+), entre $>50\%$ y $\leq 80\%$ positivos medios (++) y $>80\%$ positivos fuertes (+++).

2.4 Análisis molecular

Las fincas en las que se detectaron animales seropositivos con altos valores S/P en ELISA se visitaron una vez más, para tomar muestras de bovinos seleccionados para someter éstas a análisis molecular. En total se visitaron nueve fincas ubicadas en los distritos de Zarcero, Aguas Zarcas y Ciudad Quesada. Para el análisis de *B. besnoiti* se encontraron solo tres bovinos con lesiones en flancos y vulva en 3 fincas diferentes de Zarcero y Aguas Zarcas. Se tomaron muestras de los tres animales, los quistes se extrajeron con bisturí y se transportaron en medio mínimo esencial Dulbecco (DMEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), para el diagnóstico de *B. besnoiti*. Para el diagnóstico molecular de *C. burnetii* se tomaron muestras de leche de 22 animales en 6 fincas ubicadas en Zarcero,

Aguas Zarcas y Ciudad Quesada, recolectadas en bolsas Stomacher. De estas muestras posteriormente se realizó análisis molecular a 6 (solamente una por finca). En dos fincas de Ciudad Quesada se tomaron 4 hisopados vaginales, los cuales se guardaron en DMEM, 10% SFB. Todas las muestras se transportaron al laboratorio en condiciones de refrigeración (4°C) y se almacenaron a -20°C hasta ser procesadas mediante PCR. La extracción del ADN se realizó utilizando el kit comercial DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen®), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para *B. besnoiti* se implementó un PCR convencional que amplifica un segmento de 243 pb del segmento ITS-1 (región espaciadora transcrita interna) descrito por Fernandez-Garcia *et al.*, 2009, utilizando los siguientes iniciadores: Bb-ITS-1-F: GGG TGC ATT CGA GAA GTG TG y Bb-ITS-1-R: TCC GTG ATA GCA GAG TGA GGA GG y utilizando una mezcla de 12.5µL Master Mix, 1.25µL (10µM) de cada iniciador, 9µL de agua de grado molecular y 1µL de ADN. Como control positivo se utilizó ADN de extractos de taquizoítos y bradizoítos donado por el Dr. Gereon Schares, Instituto de Investigación Friedrich Loeffler, Greifswald, Alemania, y como control negativo agua de grado molecular. El protocolo del termociclador fue una desnaturalización inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización de 95°C por 1 minuto, hibridación de 54°C por 1 minuto, y extensión de 72°C por 1 minuto, y una extensión final de 72°C por 5 minutos. Los productos de la PCR se mezclaron con GelRed para la tinción del ADN y se utilizó el marcador de peso molecular GenRuler 1000 pb DNA Ladder Plus (Fermentas®). Las muestras amplificadas en el PCR se colocaron en un gel de agarosa al 2%, para su electroforesis a 90V por 45 minutos. Posteriormente se visualizaron las bandas con luz ultravioleta en un transiluminador BioDoc-It UVP®.

Para *C. burnetii* se implementó la PCR anidada como descrito por Rahimi *et al.* (2010), que amplifica un segmento del gen OMP (proteína de membrana externa) de un tamaño de 483pb. En la primera ronda se utilizaron los iniciadores OMP1 5'-AGT AGA AGC ATC CCA AGC ATT G-3' y OMP2 5'-TGC CTG CTA GCT GTA ACG ATT G-3', y en la segunda ronda los iniciadores OMP3 5'-GAA GCG CAA CAA GAA GAA CAC-3' y OMP4 5'-TTG GAA GTT ATC ACG CAG TTG-3'. La primera amplificación se realizó con un volumen total de 25µL con 5µL ADN, 12.5µL Master Mix, 1µL (1µM) de cada iniciador y 5µL agua grado molecular. El protocolo del termociclador fue una

desnaturalización a 94°C durante 4 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación a 56°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 1 min y una extensión final a 72°C por 7 minutos. Para la segunda ronda, la reacción se realizó con volúmenes iguales a la primera amplificación, solamente que se utilizaron los iniciadores OMP3 y OMP4 a una concentración de 0,8 μM (1 μL cada uno) y 5 μL de ADN amplificado en la primera ronda. El ensayo de PCR se realizó con una desnaturalización inicial a 95°C durante 4 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación a 57°C durante 1 minuto y extensión 72°C durante 1 min. Como control positivo se utilizó ADN de cultivos de la bacteria, donado por el Dr. Gereon Schares, como control negativo se utilizó agua de grado molecular. Los productos de la PCR se mezclaron con GelRed para la tinción del ADN y se utilizó el marcador de peso molecular GenRuler 1000 pb DNA Ladder Plus (Fermentas®). Las muestras amplificadas en el PCR se colocaron en un gel de agarosa al 2%, para su electroforesis a 90V por 45 minutos. Posteriormente se visualizaron las bandas con luz ultravioleta en un transiluminador BioDoc-It UVP®.

Para *C. abortus* se realizó una PCR anidada para amplificar parte del gen ompA (proteína A de la membrana externa) de 389-404 pb según el protocolo de Biesenkamp-Uhe *et al.* (2006) como descrito previamente por Fonseca *et al.* (2015).

Muestras amplificadas en los PCR para los tres agentes se enviaron a secuenciar a Macrogen (Corea). Las secuencias se secuenciaron con el software Bioedit 7.2.5 y compararon con las secuencias reportadas en el GenBank por medio del algoritmo BLAST.

2.5 Análisis de los datos

El tamaño de muestra permitió establecer la seroprevalencia de *B. besnoiti*, *C. burnetii* y *C. abortus* en la zona Huetar Norte, a nivel global, por distritos, y a nivel de fincas mediante la siguiente fórmula: Prevalencia = casos detectados / total de la población analizada. Los niveles de S/P se categorizaron como negativos y positivos, y estos últimos a su vez en positivos débiles, medios y fuertes, realizando un análisis descriptivo de niveles de valores S/P. Las fincas se georreferenciaron y se creó un mapa con el programa ArcGIS Online® para identificar las fincas negativas y seropositivas para cada agente, para dos o tres agentes. Finalmente se realizó análisis de coexposiciones entre agentes mediante tablas de 2 por 2.

3. Resultados

En la Región Huetar Norte se determinó seroprevalencias de 27,3%, 16,8% y 1,3% para *B. besnoiti*, *C. burnetii* y *C. abortus*, respectivamente. Animales seropositivos a besnoitiosis se encontraron en todos los distritos analizados, menos en la Fortuna, pero sobre todo en Aguas Zarcas (64,0%), Venecia (36,6%) y Zarcero (33,3%). Los animales seropositivos a coxieliosis se encontraron también distribuidos en todos los distritos, sobre todo en Zarcero (24,6%), Ciudad Quesada (19,2%) y Aguas Zarcas (17,7%). Con respecto a *C. abortus* se encontraron pocos animales seropositivos en solamente tres distritos: Aguas Zarcas (3,3%), Monterrey (3,3%) y Ciudad Quesada (2,9%) (Cuadro 1). La ubicación de las fincas seronegativas y seropositivas a los agentes se muestra en la Figura 1. A nivel de fincas se determinó seroprevalencias de 80,0%, 70,0% y 17,5% para *B. besnoiti*, *C. burnetii* y *C. abortus*, respectivamente (Cuadro 2).

Cuadro 1. Seroprevalencia de *B. besnoiti*, *C. burnetii* y *C. abortus* por animales en hatos bovinos lecheros y de doble propósito de diferentes distritos de la Región Huetar Norte de Costa Rica, 2018.

| Distrito | <i>B. besnoiti</i> | <i>C. burnetii</i> | <i>C. abortus</i> |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | % (+/total) | % (+/total) | % (+/total) |
| Aguas Zarcas | 64,4 (58/90) | 17,7 (16/90) | 3,3 (3/90) |
| Ciudad Quesada | 9,6 (13/135) | 19,2 (26/135) | 2,9 (4/135) |
| Fortuna | 0 (0/45) | 2,2 (1/45) | 0 (0/45) |
| Monterrey | 3,3 (1/30) | 10,0 (3/30) | 3,3 (1/30) |
| Muelle | 11,1 (5/45) | 8,8 (4/45) | 0 (0/45) |
| Venecia | 36,6 (22/60) | 5,0 (3/60) | 0 (0/60) |
| Zarcero | 33,3 (65/195) | 24,6 (48/195) | 0 (0/195) |
| Total % (+/total) | 27,3 (164/600) | 16,8 (101/600) | 1,3 (8/600) |

Cuadro 2. Seroprevalencia de *B. besnoiti*, *C. burnetii* y *C. abortus* a nivel de hatos bovinos lecheros y de doble propósito en diferentes distritos de la Región Huertar Norte de Costa Rica, 2018.

| Distrito | <i>B. besnoiti</i> % (+/total) | <i>C. burnetii</i> % (+/total) | <i>C. abortus</i> % (+/total) |
|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| Aguas Zarcas | 100,0 (5/5) | 83,3 (5/6) | 33,3 (2/6) |
| Ciudad Quesada | 88,8 (8/9) | 77,7 (7/9) | 44,4 (4/9) |
| Fortuna | 0 (0/4) | 33,3 (1/3) | 0 (0/3) |
| Monterrey | 100,0 (1/1) | 100,0 (2/2) | 50,0 (1/2) |
| Muelle | 100,0 (3/3) | 66,6 (2/3) | 0 (0/3) |
| Venecia | 100,0 (4/4) | 50,0 (2/4) | 0 (0/4) |
| Zarcero | 84,6 (11/13) | 69,2 (9/13) | 0 (0/13) |
| Total % (+/total) | 80,0 (32/40) | 70,0 (28/40) | 17,5 (7/40) |

Un 51,2% (84/164) de los sueros positivos a *B. besnoiti* se clasificaron como reacciones positivas débiles (+), un 27,4% (45/164) como reacciones positivas medias (++) y un 21,4% (35/164) como reacciones positivas fuertes (+++). El distrito con mayor cantidad de seropositivos en las 3 categorías (+, ++, +++) fue Zarcero (39%, 65/164) (Figura 2).

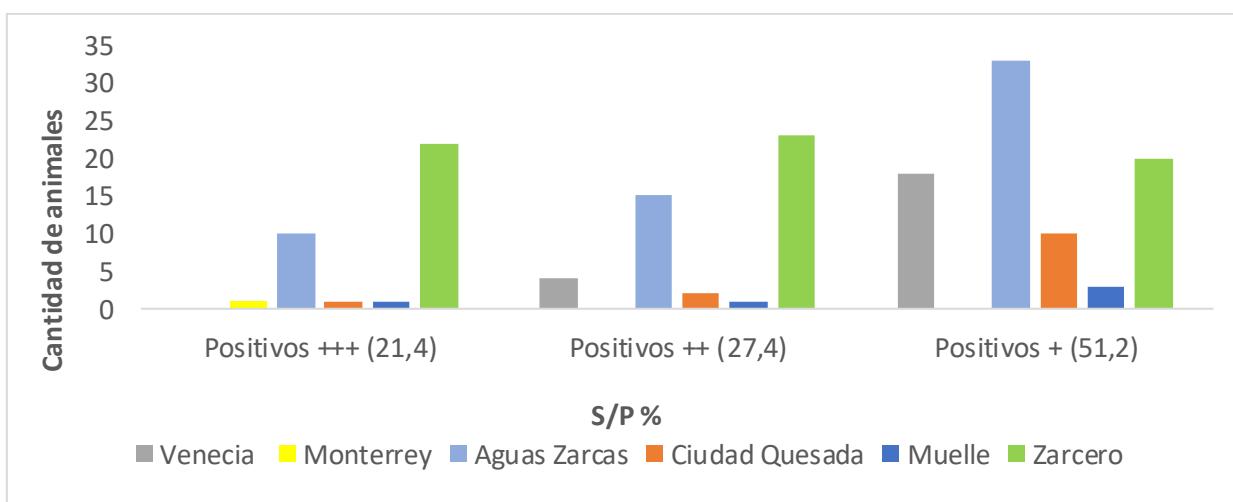


Figura 2. Distribución de animales seropositivos a *B. besnoiti* según porcentaje S/P y distritos de la Región Huertar Norte de Costa Rica, 2018.

Los sueros positivos a *C. burnetii* se ubicaron sobre todo en la categoría de reacciones positivas medias (47,5%, 48/101), seguido de reacciones positivas débiles (37,6%, 38/101) y en menor cantidad reacciones positivas altas (14,9%, 15/101). El distrito con mayor cantidad de seropositivos en las tres categorías (+, ++, +++) fue Zarcero (47%, 48/101) (Figura 3).

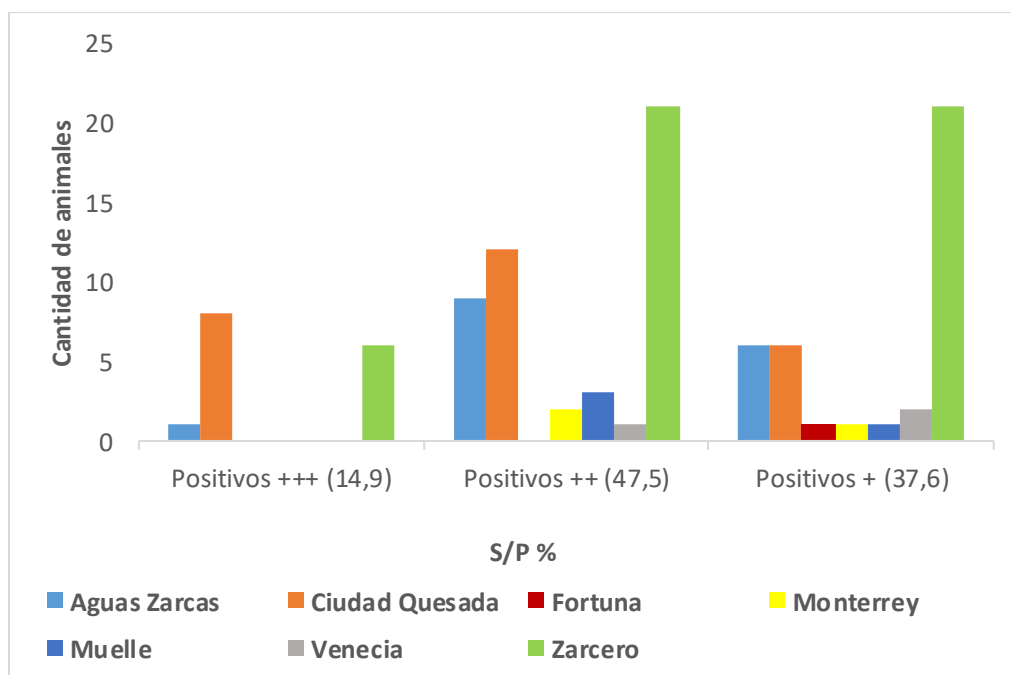


Figura 3. Distribución de animales seropositivos a *C. burnetii* según porcentaje S/P y distritos de la Región Huetar Norte de Costa Rica, 2018.

Para *C. abortus* se estableció un 87,5% de reacciones fuerte positivas (+++), un 12,5% positivos medios (++) y ningún positivo débil (+). El 50% (4/8) de los seropositivos (+++ y ++) se encontraron en Ciudad Quesada (Figura 4).

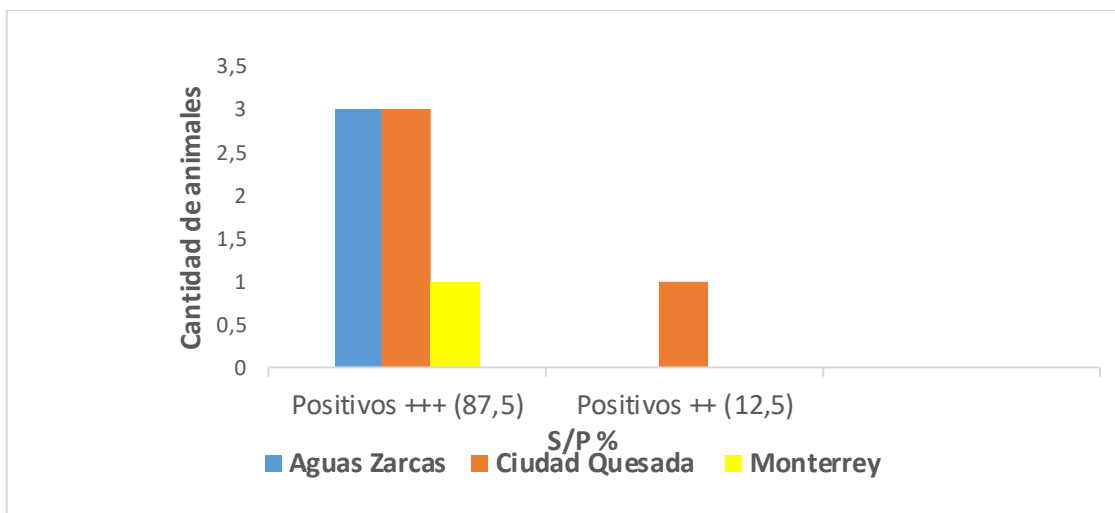


Figura 4. Distribución de animales seropositivos a *C. abortus* según porcentaje S/P y distritos de la Región Huetar Norte de Costa Rica, 2018.

En un total de 36 (6,5%) animales se detectó coexposiciones de *B. besnoiti* con *C. burnetii* (Cuadro 3), estos animales se encontraban en 12 (30,0%) hatos, sobre todo en Zarcero (10), pero también en Aguas Zarcas (1) y Ciudad Quesada (1). No se detectó coexposiciones de *B. besnoiti* y *C. abortus* (Cuadro 4), ni de *C. burnetii* y *C. abortus* (Cuadro 5).

Cuadro 3. Análisis de coexposiciones para las pruebas de serología para los sueros positivos para *B. besnoiti* y *C. burnetii*.

| | | <i>C. burnetii</i> | | Total |
|--------------------|-------|--------------------|-----|-------|
| | | + | - | |
| <i>B. besnoiti</i> | + | 39 | 125 | 164 |
| | - | 62 | 374 | 436 |
| | Total | 101 | 499 | 600 |

Cuadro 4. Análisis de coexposiciones para las pruebas de serología para los sueros positivos para *B. besnoiti* y *C. abortus*.

C. abortus

| | | + | - | Total |
|--------------------|---|----------|-----|-------|
| <i>B. besnoiti</i> | + | 0 | 164 | 164 |
| | - | 8 | 428 | 436 |
| Total | | 8 | 592 | 600 |

Cuadro 5. Análisis de coexposiciones para las pruebas de serología para los sueros positivos para *C. burnetii* y *C. abortus*.

C. abortus

| | | + | - | Total |
|--------------------|---|----------|-----|-------|
| <i>C. burnetii</i> | + | 0 | 101 | 101 |
| | - | 8 | 491 | 499 |
| Total | | 8 | 592 | 600 |

Se logró implementar los PCR para *B. besnoiti* y *C. burnetii* (Figuras 5 y 6). Las muestras de quistes, las muestras de leche y las muestras de hisopados vaginales resultaron negativas en el PCR de *B. besnoiti*, *C. burnetii* y *C. abortus*, respectivamente.

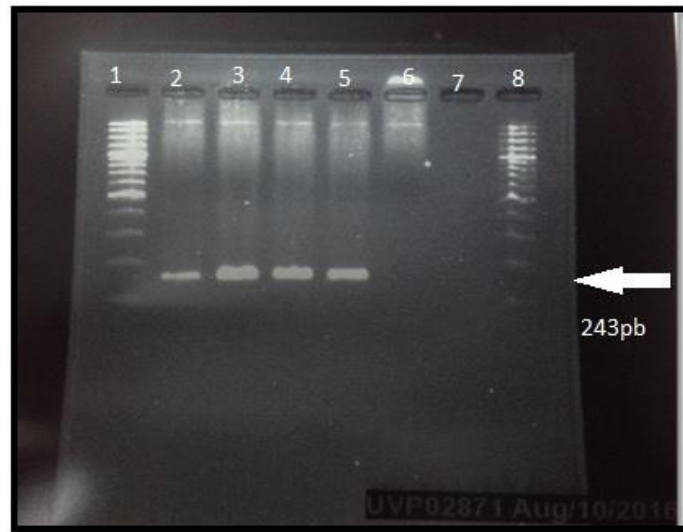


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR para *Besnoitia besnoiti* (1: Marcador molecular, 2: Control positivo 0,5ul ADN, 3, 4 y 5: Control positivo 5μl, 6: Control negativo, 8: Marcador molecular).



Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR anidada para *Coxiella burnetii* (1: Marcador molecular, 2 y 3: Control positivo, 4: Muestra de leche negativa, 5: Control positivo, 6: Control negativo, 7: Marcador molecular).

4. Discusión

Se logró determinar por primera vez la prevalencia serológica de *B. besnoiti* (27,3%), *C. burnetii* (16,8%) y *C. abortus* (1,3%) en la zona Huetar Norte de Costa Rica. Además, es el primer reporte de seroprevalencia para *B. besnoiti* y *C. burnetii* para Costa Rica y Centroamérica. Para *B. besnoiti* Uzeda *et al.* (2014), obtuvieron un 3,4% (70/2014) de seroprevalencia en Brasil, mediante la técnica de IFAT. No se tienen datos de prevalencia en otros países de América, pero en bovinos de leche en Australia (18,4%, 159/869) mediante la técnica de ELISA (Nasir *et al.*, 2012) y un 87,3% (55/63) en hatos bovinos de España mediante un ELISA casero (Gutiérrez-Expósito *et al.*, 2014). En Europa la enfermedad se considera endémica y la presentación de la enfermedad se reporta más en bovinos de carne por su manejo extensivo y porque la monta natural es una vía de transmisión. Además, se reporta más en animales mayores de los 2 años y más en machos que en hembras (Álvarez-García *et al.*, 2014). En Costa Rica la alta prevalencia de anticuerpos, tanto en un análisis preliminar (Fallas *et al.*, 2017) como en el presente estudio, muestran la necesidad de seguir investigando sobre la epidemiología e importancia de este protozooario en nuestro país. Aunque en el presente estudio no se logró detectar molecularmente el agente en los quistes que presentaron algunos bovinos seropositivos, esto se puede haber debido a la forma en que se tomó la muestra (raspado del quiste), ya que los productores no estaban anuentes a que se tomara una biopsia, para no dañar el cuero, y también al pequeño número de muestras que se lograron analizar (Jacquet *et al.*, 2010). Además, es posible que existan variaciones antigénicas del parásito, con respecto al reportado en Europa, por lo que se recomienda realizar estudios con biopsias y utilizar pruebas de PCR para el género de *Besnoitia* (Uzeda *et al.*, 2014). Es importante recalcar, que la seroprevalencia determinada para *B. besnoiti* en el presente estudio no se debió a resultados falsos positivos, ya que el ELISA utilizado reportó una Se y Sp de 97,2% y 100%; y valores predictivos positivo y negativo de 100,0% y 99,0%, respectivamente.

Los casos positivos de besnoitiosis se encontraron sobre todo en los distritos de Zarcero (39,6%, n=65/164) y Aguas Zarcas (35,3%, 58/164), presentando sobre todo reacciones positivas débiles: (51,2%, 84/164). Estos resultados concuerdan con los de Esteban-Gil *et al.* (2014), que indican, que existe correlación entre signos clínicos y títulos de anticuerpos, así,

animales con signos clínicos presentarán títulos de anticuerpos más altos en el suero que animales sin lesiones. En nuestro caso los animales no mostraron signos clínicos, lo que podría explicar las reacciones positivas débiles. Sin embargo, por tratarse de una infección persistente, para la que aún no se cuenta con medicamentos o vacunas, se debe prevenir su diseminación en los hatos, detectando animales seropositivos, eliminando los animales que presenten casos clínicos y controlando los vectores (Gollnick *et al.*, 2015).

La prevalencia de *C. burnetii* (16,8%) determinada en la Región Huetar Norte es similar a la reportada en bovinos de leche de Nuevo León, México (28,0%), en una zona con un microclima subtropical como Costa Rica y utilizando un ELISA indirecto (Salinas-Méndez *et al.* 2002). El número de sueros analizados, como la sensibilidad y especificidad de la técnica utilizada permitieron establecer la prevalencia de *C. burnetii* en la región Huetar Norte y descartar reacciones falsas positivas. Los distritos que presentaron mayor cantidad de seropositivos fueron Zarcero (47,5%, 48/101) y Ciudad Quesada (25,7%, 26/101), mostrando sobre todo reacciones positivas medias (47,5%, 48/101). Como la infección se considera persistente en bovinos, y *C. burnetii* se considera un agente zoonótico, que se transmite a las personas mediante leche, productos de abortos, orina o heces de animales infectados, es importante dar seguimiento a estos hatos seropositivos e informar a las autoridades de salud, para que tomen las medidas correspondientes (Kersh *et al.*, 2013; OIE, 2021). Se recomienda implementar medidas de bioseguridad en estos hatos, para prevenir una diseminación del agente a otros hatos (Paul *et al.*, 2012) y tratar de aislar el agente. En el presente trabajo no se logró determinar la presencia del agente en la leche de vacas seropositivas, probablemente, por el reducido número de muestras analizadas (n=6), y porque el agente es excretado en forma intermitente en la leche de los bovinos (Kersh *et al.*, 2013). Se recomienda, realizar más investigaciones, para determinar la presencia del agente en hatos bovinos de Costa Rica y establecer si ocurren manifestaciones clínicas en los bovinos, como aborto, muerte fetal, partos de crías débiles o prematuros. o si cursa en forma asintomática (Saegerman *et al.*, 2015), además, si las personas que trabajan con estos animales han presentado fiebre, cefalea, mialgias, tos, fatiga, escalofríos, sudores nocturnos, náuseas o vómitos debido a la Fiebre Q (McQuiston *et al.*, 2002). Para controlar esta zoonosis es importante también controlar las garrapatas, que podrían transmitir el agente entre los animales, también es importante recordar que las bacterias son excretadas con las heces, orina

o membranas fetales de animales infectados, y pueden permanecer viables durante meses y ser transportadas en forma de polvo por el viento a otros lugares, representando así una fuente de infección para personas y animales (Salinas-Méndez *et al.*, 2002).

La prevalencia determinada para *C. abortus* fue baja (1,3%), en concordancia con resultados obtenidos previamente en bovinos de Poás (0,5%) y ovinos (5,2%) (Villagra-Blanco *et al.*, 2015; Salazar *et al.*, 2015). Los distritos en los que se encontró la mayor cantidad de seropositivos fueron en Ciudad Quesada (n=4) y Aguas Zarcas (n=3), mostrando reacciones fuertes positivas 87,5% (7/8), que según O'Neill *et al.* (2018) indican que los animales probablemente habían abortado recientemente. A pesar de que no se pudo determinar la presencia del agente en muestras vaginales, probablemente por la pequeña cantidad de muestras analizadas (n=4), por la excreción intermitente del agente o por la baja seroprevalencia determinada, es importante seguir realizando investigaciones para establecer su presencia en el país y tomar en cuenta este agente como diagnóstico diferencial en abortos (Borel *et al.*, 2010). En un 6,5% (39/600) de los casos se establecieron coexposiciones *B. besnoiti* y *C. burnetii*, lo cual no ha sido reportado con anterioridad. Se recomienda divulgar a productores y veterinarios los resultados obtenidos en la presente investigación, alertar a las autoridades de salud sobre la presencia de agentes zoonóticos en fincas bovinas de la Región Huetar Norte y realizar más estudios para aislar los agentes detectados.

5. Conclusiones

- Se determinó por primera vez la presencia de anticuerpos contra *B. besnoiti*, *C. burnetii* y *C. abortus* en bovinos de la región Huetar Norte de Costa Rica.
- Se determinó una seroprevalencia de 27,3% para *B. besnoiti*, 16,8% para *C. burnetii* y de 1,3% para *C. abortus* en los bovinos de la región Huetar Norte de Costa Rica.
- Se determinó seroprevalencias de 80,0%, 70,0% y 17,5% para *B. besnoiti*, *C. burnetii* y *C. abortus* a nivel de fincas, respectivamente.
- Se estableció la presencia de coexposiciones para *B. besnoiti* y *C. burnetii* en un 6,5% de las muestras analizadas.

6. Recomendaciones

- Informar sobre los resultados y capacitar a los productores para que reconozcan las patologías y eviten la introducción de los agentes en sus hatos.
- Promover el control de vectores artópodos para prevenir la transmisión de *B. besnoiti* y *C. burnetii*.
- Alertar a las autoridades de SENASA sobre los hallazgos, para que tomen las previsiones del caso y eviten la diseminación de los agentes infecciosos hallados en este estudio, en particular de *C. burnetii* y *C. abortus* por su potencial zoonótico.
- Alertar a las autoridades de MINSA para que incluyan la coxieliosis y clamidiosis como diagnóstico diferencial en casos de insuficiencia cardíaca valvular, enfermedades respiratorias y abortos.
- Realizar estudios para confirmar la presencia de los tres agentes mediante técnicas de aislamiento o diagnóstico molecular.

7. Referencias bibliográficas

- Agerholm, J. S. (2013). *Coxiella burnetii* associated reproductive disorders in domestic animals-a critical review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55(1), 13.
- Alemneh, T., & Ayelign, M. (2018). Q fever (coxiellosis) in animals and humans. *Poultry Dairy and Veterinary Science*, 5(4), 1-9.
- Álvarez-García, G., Frey, C. F., Mora, L. M. O., & Schares, G. (2013). A century of bovine besnoitiosis: an unknown disease re-emerging in Europe. *Trends in parasitology*, 29(8), 407-415.
- Alvarez-Garcia, G., Garcia-Lunar, P., Gutierrez-Exposito, D., Shkap, V., & Ortega-Mora, L. M. (2014). Dynamics of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle. *Parasitology*, 141(11), 1419-1435.
- Arricau-Bouvery, N., & Rodolakis, A. (2005). Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis?. *Veterinary research*, 36(3), 327-349
- Baud, D., Regan, L., & Greub, G. (2008). Emerging role of *Chlamydia* and *Chlamydia*-like organisms in adverse pregnancy outcomes. *Current opinion in infectious diseases*, 21(1), 70-76.
- Berri, M., Rousset, E., Champion, J. L., Russo, P., & Rodolakis, A. (2007). Goats may experience reproductive failures and shed *Coxiella burnetii* at two successive parturitions after a Q fever infection. *Research in veterinary science*, 83(1), 47-52.
- Bielawska-Drózd, A., Cieślik, P., Mirski, T., Gawęł, J., Michalski, A., Niemcewicz, M., ... & Kocik, J. (2014). Prevalence of *Coxiella burnetii* in environmental samples collected from cattle farms in Eastern and Central Poland (2011–2012). *Veterinary microbiology*, 174(3), 600-606.
- Biesenkamp-Uhe, C., Li, Y., Hehnen, H.R., Sachse, K., Kaltenboeck, B. (2007). Therapeutic *Chlamydophila abortus* and *C. pecorum* vaccination transiently reduces bovine mastitis associated with *Chlamydophila* Infection. *Infection and Immunity* 75, 870–877.
- Borel, N., Thoma, R., Spaeni, P., Weilenmann, R., Teankum, K., Brugnera, E., ... & Pospischil, A. (2006). *Chlamydia*-related abortions in cattle from Graubunden, Switzerland. *Veterinary Pathology*, 43(5), 702-708.

- Borel, N., Dumrese, C., Ziegler, U., Schifferli, A., Kaiser, C., & Pospischil, A. (2010). Mixed infections with Chlamydia and porcine epidemic diarrhea virus—a new in vitro model of chlamydial persistence. *BMC microbiology*, 10(1), 1-9.
- Campos-Hernández, E., Vázquez-Chagoyán, J. C., Salem, A. Z., Saltijeral-Oaxaca, J. A., Escalante-Ochoa, C., López-Heydeck, S. M., & de Oca-Jiménez, R. M. (2014). Prevalence and molecular identification of Chlamydia abortus in commercial dairy goat farms in a hot region in Mexico. *Tropical animal health and production*, 46(6), 919-924.
- Cannon, R.M. & R.T. Roe, 1982. *Livestock disease survey: a field manual for veterinarians*. Australian Government Publishing Service, Canberra.
- Cortes, H. C., Reis, Y., Gottstein, B., Hemphill, A., Leitão, A., & Müller, N. (2007). Application of conventional and real-time fluorescent ITS1 rDNA PCR for detection of Besnoitia besnoiti infections in bovine skin biopsies. *Veterinary parasitology*, 146(3-4), 352-356.
- Cortes, H., Leitao, A., Gottstein, B., & Hemphill, A. (2014). A review on bovine besnoitiosis: a disease with economic impact in herd health management, caused by Besnoitia besnoiti (Franco and Borges, 1916). *Parasitology*, 141(11), 1406-1417.
- Czopowicz, M., Kaba, J., Szalus-Jordanow, O., Nowicki, M., Witkowski, L., Nowicka, D., & Frymus, T. (2010). Prevalence of antibodies against Chlamydophila abortus and Coxiella burnetii in goat herds in Poland. *Pol J Vet Sci*, 13(1), 175-179.
- Damasceno, I. A. D. M., & Guerra, R. C. (2018). Coxiella burnetii and Q fever in Brazil: a public health issue. *Ciência & Saúde Coletiva*, 23(12), 4231-4239.
- Díaz, J. M., Fernández, G., Prieto, A., Valverde, S., Lago, N., Díaz, P., ... & Díez-Baños, P. (2014). Epidemiology of reproductive pathogens in semi-intensive lamb-producing flocks in North-West Spain: A comparative serological study. *The Veterinary Journal*, 200(2), 335-338.
- Duron, O., Noël, V., McCoy, K. D., Bonazzi, M., Sidi-Boumedine, K., Morel, O., ... & Arnathau, C. (2015). The recent evolution of a maternally-inherited endosymbiont of ticks led to the emergence of the Q fever pathogen, Coxiella burnetii. *PLoS Pathog*, 11(5), e1004892.

- Esteban-Gil, A., Grisez, C., Prévot, F., Florentin, S., Decaudin, A., Picard-Hagen, N., ... & Jacquet, P. (2014). No detection of *Besnoitia besnoiti* DNA in the semen of chronically infected bulls. *Parasitology research*, 113(6), 2355-2362.
- Fallas-Elizondo, D., Chacón-Calderón, J., Romero-Zúñiga, J.J., Dolz, G. (2017). Evidencia serológica de *Besnoitia besnoiti*, *Toxoplasma gondii*, *Coxiella burnetii* y *Chlamydia abortus* en hatos bovinos de Costa Rica. Ponencia en XXI Congreso Nacional de Medicina Veterinaria, Colegio de Médicos Veterinarios de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- Fernandez-García, A., Alvarez-García, G., Risco-Castillo, V., Aguado-Martínez, A., Marugan-Hernández, V., & Ortega-Mora, L. M. (2009). Pattern of recognition of *Besnoitia besnoiti* tachyzoite and bradyzoite antigens by naturally infected cattle. *Veterinary parasitology*, 164(2), 104-110.
- Fariñas, M. T. F., & Collado, C. M. (2010). Infección por *Coxiella burnetii* (fiebre Q). *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 28, 29-32.
- Fonseca Salazar, L. (2014). *Chlamydia abortus* en ganado lechero de la zona norte de Heredia y Alajuela, Costa Rica.
- García-Lunar, P., Ortega-Mora, L. M., Schares, G., Gollnick, N. S., Jacquet, P., Grisez, C., ... & Álvarez-García, G. (2013). An Inter-Laboratory Comparative Study of Serological Tools Employed in the Diagnosis of *Besnoitia besnoiti* Infection in Bovines. *Transboundary and emerging diseases*, 60(1), 59-68.
- Gollnick, N. S., Scharr, J. C., Schares, G., & Langenmayer, M. C. (2015). Natural *Besnoitia besnoiti* infections in cattle: chronology of disease progression. *BMC veterinary research*, 11(1), 1-16.
- Gutiérrez-Expósito, D., Esteban-Gil, A., Ortega-Mora, L. M., García-Lunar, P., Castillo, J. A., Marcén, J. M., & Alvarez-García, G. (2014). Prevalence of *Besnoitia besnoiti* infection in beef cattle from the Spanish Pyrenees. *The Veterinary Journal*, 200(3), 468-470.
- Hireche, S., Ababneh, M. M. K., Bouaziz, O., & Boussena, S. (2016). Seroprevalence and molecular characterization of *Chlamydia abortus* in frozen fetal and placental tissues of aborting ewes in northeastern Algeria. *Tropical animal health and production*, 48(2), 255-262.

- IDVET. (2016). ID Screen® Q Fever Indirect Multi-species sensitivity Quality Control Data Sheet [Pamphlet]. Montpellier: IDVET.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos (2014). Censo Agropecuario 2014. Resultados generales ganado vacuno. En línea: <http://www.inec.go.cr/censos/censo-agropecuario-2014>
- Instituto Meteorológico Nacional (2008). Clima en Costa Rica- Zona Norte. En línea: <https://www.imn.ac.cr/documents/10179/31165/ZonaNorte.pdf/c08ed9c6-3d27-4f76-a20a-7cac913fb6d8>
- Jacquiet, P., Liénard, E., & Franc, M. (2010). Bovine besnoitiosis: epidemiological and clinical aspects. *Veterinary parasitology*, 174(1), 30-36.
- Jaton, K., Peter, O., Raoult, D., Tissot, J. D., & Greub, G. (2013). Development of a high throughput PCR to detect *Coxiella burnetii* and its application in a diagnostic laboratory over a 7-year period. *New microbes and new infections*, 1(1), 6-12.
- Kaltenboeck, B., Kousoulas, K. G., & Storz, J. (1992). Two-step polymerase chain reactions and restriction endonuclease analyses detect and differentiate ompA DNA of *Chlamydia* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(5), 1098-1104.
- Kersh, G. J., Fitzpatrick, K. A., Self, J. S., Priestley, R. A., Kelly, A. J., Lash, R. R., ... & Anderson, A. D. (2013). Presence and persistence of *Coxiella burnetii* in the environments of goat farms associated with a Q fever outbreak. *Applied and environmental microbiology*, 79(5), 1697-1703.
- Kılıç, A., Kalender, H., Koç, O., Kılınç, Ü., Irehan, B., & Berri, M. (2016). Molecular investigation of *Coxiella burnetii* infections in aborted sheep in eastern Turkey. *Iranian journal of veterinary research*, 17(1), 41.
- Kirkan, Ş., Kaya, O., Tekbiyik, S., & Parin, U. (2008). Detection of *Coxiella burnetii* in cattle by PCR. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 32(3), 215-220.
- Liu, L., Baoliang, X., Yingqun, F., Ming, L., Yu, Y., Yong, H., ... & Xiaohong, S. (2013). *Coxiella burnetii* in rodents on Heixiazi Island at the Sino-Russian Border. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 88(4), 770-773.
- Longbottom, D., & Coulter, L. J. (2003). Animal chlamydioses and zoonotic implications. *Journal of comparative pathology*, 128(4), 217-244.

- Mares-Guia, M. A. M. D. M., Rozental, T., Guterres, A., Gomes, R., Almeida, D. N. D., Moreira, N. S., ... & Lemos, E. R. S. D. (2014). Molecular identification of the agent of Q fever—*Coxiella burnetii*—in domestic animals in State of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47, 231-234.
- McQuiston, J. H., Childs, J. E., & Thompson, H. A. (2002). Q fever. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 221(6), 796-799.
- Mioni, M. D. S. R., Costa, F. B., Ribeiro, B. L. D., Teixeira, W. S. R., Pelicia, V. C., Labruna, M. B., ... & Megid, J. (2020). *Coxiella burnetii* in slaughterhouses in Brazil: A public health concern. *Plos one*, 15(10), e0241246.
- Nasir, A., Lanyon, S. R., Schares, G., Anderson, M. L., & Reichel, M. P. (2012). Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Besnoitia besnoiti* in South Australian beef and dairy cattle. *Veterinary Parasitology*, 186(3-4), 480-485.
- Noda, A. A., Rodríguez, I., Miranda, J., Contreras, V., & Mattar, S. (2016). First molecular evidence of *Coxiella burnetii* infecting ticks in Cuba. *Ticks and tick-borne diseases*, 7(1), 68-70.
- O'Neill, L. M., O'Driscoll, Á., & Markey, B. (2018). Comparison of three commercial serological tests for the detection of *Chlamydia abortus* infection in ewes. *Irish veterinary journal*, 71(1), 1-9.
- OIE (2021). Fichas de información general sobre enfermedades animales- Fiebre Q. Recuperado de: <https://www.oie.int/doc/ged/D13999.PDF>
- Pacheco, R. C., Echaide, I. E., Alves, R. N., Beletti, M. E., Nava, S., & Labruna, M. B. (2013). *Coxiella burnetii* in ticks, Argentina. *Emerging infectious diseases*, 19(2), 344.
- Paul, S., Agger, J. F., Markussen, B., Christoffersen, A. B., & Agerholm, J. S. (2012). Factors associated with *Coxiella burnetii* antibody positivity in Danish dairy cows. *Preventive veterinary medicine*, 107(1-2), 57-64.
- Pearson, T., Hornstra, H. M., Hilsabeck, R., Gates, L. T., Olivas, S. M., Birdsell, D. M., ... & Keim, P. (2014). High prevalence and two dominant host-specific genotypes of *Coxiella burnetii* in US milk. *BMC microbiology*, 14(1), 1-9.
- Pexara, A., Solomakos, N., & Govaris, A. (2018). Q fever and prevalence of *Coxiella burnetii* in milk. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 65-72.

- Rahimi, E., Doosti, A., Ameri, M., Kabiri, E., & Sharifian, B. (2010). Detection of *Coxiella burnetii* by nested PCR in bulk milk samples from dairy bovine, ovine, and caprine herds in Iran. *Zoonoses and public health*, 57(7-8), e38-e41.
- Reinhold, P., Sachse, K., & Kaltenboeck, B. (2011). Chlamydiaceae in cattle: commensals, trigger organisms, or pathogens?. *The Veterinary Journal*, 189(3), 257-267.
- Rinaldi, L., Maurelli, M. P., Musella, V., Bosco, A., Cortes, H., & Crincoli, G. (2013). First cross-sectional serological survey on *Besnoitia besnoiti* in cattle in Italy. *Parasitology research*, 112(4), 1805-1807.
- Runge, M., Binder, A., Schotte, U., & Ganter, M. (2012). Investigations concerning the prevalence of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia abortus* in sheep in correlation with management systems and abortion rate in Lower Saxony in 2004. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 125, 138-143.
- Sachse, K., Vretou, E., Livingstone, M., Borel, N., Pospischil, A., & Longbottom, D. (2009). Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Veterinary microbiology*, 135(1-2), 2-21.
- Saegerman, C., Speybroeck, N., Dal Pozzo, F., & Czaplicki, G. (2015). Clinical indicators of exposure to *Coxiella burnetii* in dairy herds. *Transboundary and emerging diseases*, 62(1), 46-54.
- Salazar, L. F., Herrera, J. M., Zúñiga, J. J. R., & Dolz, G. (2015). *Chlamydia abortus* in Dairy Farms in Costa Rica. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 5(4), 179-185.
- Salinas-Meléndez, J. A., Avalos-Ramírez, R., Riojas-Valdez, V., Kawas-Garza, J., & Fimbres-Durazo, H. (2002). Estudio serológico de la fiebre 'Q' en animales de Nuevo León. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 44(2), 75-78.
- Schares, G., Basso, W., Majzoub, M., Cortes, H. C. E., Rostaher, A., Selmair, J., ... & Gollnick, N. S. (2009). First in vitro isolation of *Besnoitia besnoiti* from chronically infected cattle in Germany. *Veterinary parasitology*, 163(4), 315-322.
- Schares, G., Basso, W., Majzoub, M., Rostaher, A., Scharr, J. C., Langenmayer, M. C., ... & Haupt, T. (2011). Evaluation of a commercial ELISA for the specific detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti*. *Veterinary parasitology*, 175(1-2), 52-59.
- Selim, A., Manaa, E. A., Waheed, R. M., & Alanazi, A. D. (2021). Seroprevalence, associated risk factors analysis and first molecular characterization of chlamydia

- abortus among Egyptian sheep. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 74, 101600.
- Silva-Zacarias, F. G. D., Alfieri, A. A., Spohr, K. A. H., Lima, B. A. D. C., Negrão, F. J., Lunardi, M., & Freitas, J. C. D. (2009). Validation of a PCR assay for *Chlamydochlamydia abortus* rRNA gene detection in a murine model. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52, 99-106.
- Slaba, K., Skultety, L., & Toman, R. (2005). Efficiency of various serological techniques for diagnosing *Coxiella burnetii* infection. *Acta Virol*, 49(2), 123-7.
- Souza, E. A. R. D., Castro, E. M. S. D., Oliveira, G. M. B. D., Azevedo, S. S., Peixoto, R. D. M., Labruna, M. B., & Horta, M. C. (2018). Serological diagnosis and risk factors for *Coxiella burnetii* in goats and sheep in a semi-arid region of Northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 27(4), 514-520.
- Stephens, R. S., Myers, G., Eppinger, M., & Bavoil, P. M. (2009). Divergence without difference: phylogenetics and taxonomy of *Chlamydia* resolved. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 55(2), 115-119.
- Sun, W. W., Meng, Q. F., Cong, W., Shan, X. F., Wang, C. F., & Qian, A. D. (2015). Herd-level prevalence and associated risk factors for *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Chlamydia abortus* and bovine viral diarrhoea virus in commercial dairy and beef cattle in eastern, northern and northeastern China. *Parasitology research*, 114(11), 4211-4218.
- Tarabla, H. (2020). *Epidemiología diagnóstica*. 1a ed.-Santa Fe: Ediciones UNL, 2020.
- Uzeda, R. S., Andrade, M. R., Corbellini, L. G., Antonello, A. M., Vogel, F. S., & Gondim, L. F. P. (2014). Frequency of antibodies against *Besnoitia besnoiti* in Brazilian cattle. *Veterinary parasitology*, 199(3-4), 242-246.
- Van Schaik, E. J., Chen, C., Mertens, K., Weber, M. M., & Samuel, J. E. (2013). Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *Nature Reviews Microbiology*, 11(8), 561.
- Vanderburg, S., Rubach, M. P., Halliday, J. E., Cleaveland, S., Reddy, E. A., & Crump, J. A. (2014). Epidemiology of *Coxiella burnetii* infection in Africa: a OneHealth systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(4), e2787.

- Villagra-Blanco, R., Dolz, G., Montero-Caballero, D., & Romero-Zúñiga, J. J. (2015). Detection of antibodies against *Chlamydophila abortus* in Costa Rican sheep flocks. *Open veterinary journal*, 5(2), 122-126.
- Wilson, K., Livingstone, M., & Longbottom, D. (2009). Comparative evaluation of eight serological assays for diagnosing *Chlamydophila abortus* infection in sheep. *Veterinary microbiology*, 135(1-2), 38-45.
- Yin, L., Schautteet, K., Kalmar, I. D., Bertels, G., Van Driessche, E., Czaplicki, G., ... & Vanrompay, D. (2014). Prevalence of *Chlamydia abortus* in Belgian ruminants. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 83(4), 164-170.
- Zacarias, J. A. (2009). *Epidemiología (seroprevalencia y vectores) de la besnoitiosis bovina en las sierras de Urbasa y Andía (Navarra) (Doctoral dissertation, Universidad de Zaragoza)*.

DISCUSIÓN GENERAL

Los hallazgos de la primera parte del estudio concuerdan con lo reportado por García-Lunar *et al.* (2015), que las pruebas serológicas de IDVET® presentan un excelente desempeño en el diagnóstico de parásitos apicomplexa. Para determinar el desempeño de la sensibilidad y especificidad de las técnicas serológicas, generalmente se utilizan análisis de puntos de corte, que utiliza la media y dos o tres desviaciones estándar (Gutiérrez *et al.*, 1994; Lenfant, 2013; Mangili *et al.*, 2011; Alvarez-García *et al.*, 2013). En el presente caso se determinó los valores predictivos mediante un metaanálisis, que permite determinar el desempeño de las técnicas. En la literatura no se encontraron valores predictivos de las pruebas de ELISA utilizadas, de modo que este trabajo reporta por primera vez estos datos. Los altos VPP determinados para los inmunoensayos de *T. gondii* (91,4%) y *B. besnoiti* (100%), indican un buen desempeño de ambas pruebas para detectar verdaderos positivos, confirmando reportes previos y estableciendo la presencia de estos agentes en nuestro país (Arias *et al.*, 1994).

En contraste, con el ELISA de *N. caninum*, se obtuvo un valor de VPP intermedio (64,7%), debido a la baja especificidad (88%) y baja positividad (18%) establecida. Estos resultados (ninguna reacción falsa positiva con *B. besnoiti*, 2,7% con *T. gondii* y 9,7% con *N. caninum*) son importantes tomar en cuenta por veterinarios y productores, cuando se toman decisiones de descartar animales en base a resultados serológicos, ya que se podrían estar descartando animales sanos, afectando la productividad de la finca por un problema de baja especificidad de una prueba diagnóstica (Awinda *et al.*, 2013).

Las tres pruebas mostraron altos VPN (*T. gondii* 98,5%, *B. besnoiti* 99% y *N. caninum* 100%), indicando que solamente en menos de 1,5% de los casos pueden ocurrir reacciones falsas negativas, lo que concuerda con Bravo-Grau & Cruz (2015), que encontraron VPN altos cuando las prevalencias son bajas. A pesar de que es baja la probabilidad de obtener resultados falsos negativos con los ELISA, es importante considerarlos, ya que estos parásitos apicomplexa ocasionan infecciones persistentes, y animales infectados pueden pasar los parásitos a su progenie y perpetuarse así en los hatos, además pueden ser

transmitidos a otros animales a través de vectores (artrópodos) como en el caso de *Besnoitia* (Alvarez-Garcia *et al.*, 2016).

Se reporta por primera vez la seropositividad de *T. gondii* (30,6%) y *N. caninum* (18,0%) en la zona Huetar Norte. Estudios previos habían reportado prevalencias de *N. caninum* de 39,7% en fincas de la zona de Poás de Alajuela (Romero *et al.*, 2002) y de un 34.4% para *T. gondii* a nivel nacional (Arias *et al.*, 1994). En el caso de *N. caninum*, la prevalencia fue más baja que la reportada por Romero *et al.* (2002), probablemente porque en los últimos 20 años se han realizado charlas sobre la enfermedad, de modo que los veterinarios y productores han tomado conciencia de solicitar el diagnóstico de neosporosis en caso de abortos (Romero *et al.*, 2005).

La prevalencia de *T. gondii* es similar a la reportada en 1994, esto se puede deber a que no es diagnosticada regularmente (como si lo es *N. caninum*). Sin embargo, se considera importante alertar a veterinarios y productores, porque además de que puede estar ocasionando pérdidas económicas en los hatos por abortos (Stelzer *et al.*, 2019) es un agente zoonótico, y pareciera que actualmente desatendido en la producción pecuaria (Stelzer *et al.*, 2019).

Se estableció un buen desempeño de los ELISA y se confirmó la presencia serológica de los tres agentes apicomplexa en hatos bovinos de la Región Huetar Norte de Costa Rica. Se recomienda realizar estudios sobre el impacto que tienen estos agentes en la producción bovina de esta región, en infecciones sencillas o concomitantes, además implementar programas de educación y control para lograr reducir la toxoplasmosis de hatos bovinos.

En el segundo estudio se logró determinar por primera vez la prevalencia serológica de *B. besnoiti* (27,3%), *C. burnetii* (16,8%) y *C. abortus* (1,3%) en la zona Huetar Norte de Costa Rica. Además, es el primer reporte de seroprevalencia para *B. besnoiti* y *C. burnetii* para Costa Rica y Centroamérica. Para *B. besnoiti* Uzeda *et al.* (2014), obtuvieron un 3,4% (70/2014) de seroprevalencia en Brasil, mediante la técnica de IFAT. No se tienen datos de prevalencia en otros países de América, pero en bovinos de leche en Australia (18,4%, 159/869) mediante la técnica de ELISA (Nasir *et al.*, 2012) y un 87,3% (55/63) en hatos bovinos de España mediante un ELISA casero (Gutiérrez-Expósito *et al.*, 2014). En Europa la enfermedad se considera endémica y la presentación de la enfermedad se reporta más en bovinos de carne por su manejo extensivo y porque la monta natural es una vía de

transmisión. Además, se reporta más en animales mayores de los 2 años y más en machos que en hembras (Álvarez-García *et al.*, 2014). En Costa Rica la alta prevalencia de anticuerpos, tanto en un análisis preliminar (Fallas *et al.*, 2018) como en el presente estudio, muestran la necesidad de seguir investigando sobre la epidemiología e importancia de este protozoario en nuestro país. Aunque en el presente estudio no se logró detectar molecularmente el agente en los quistes que presentaron algunos bovinos seropositivos, esto se puede haber debido a la forma en que se tomó la muestra (raspado del quiste), ya que los productores no estaban anuentes a que se tomara una biopsia, para no dañar el cuero, y también al pequeño número de muestras que se lograron analizar (Jacquiet *et al.*, 2010). Además, es posible que existan variaciones antigénicas del parásito, con respecto al reportado en Europa, por lo que se recomienda realizar estudios con biopsias y utilizar pruebas de PCR para el género de *Besnoitia* (Uzeda *et al.*, 2014). Es importante recalcar, que la seroprevalencia determinada para *B. besnoiti* en el presente estudio no se debió a resultados falsos positivos, ya que el ELISA utilizado reportó una Se y Sp de 97,2% y 100%; y valores predictivos positivo y negativo de 100,0% y 99,0%, respectivamente.

Los casos positivos de besnoitiosis se encontraron sobre todo en los distritos de Zarcero (39,6%, n=65/164) y Aguas Zarcas (35,3%, 58/164), presentando sobre todo reacciones positivas débiles: (51,2%, 84/164). Estos resultados concuerdan con los de Esteban-Gil *et al.* (2014), que indican, que existe correlación entre signos clínicos y títulos de anticuerpos, así, animales con signos clínicos presentarán títulos de anticuerpos más altos en el suero que animales sin lesiones. En nuestro caso los animales no mostraron signos clínicos, lo que podría explicar las reacciones positivas débiles. Sin embargo, por tratarse de una infección persistente, para la que aún no se cuenta con medicamentos o vacunas, se debe prevenir su diseminación en los hatos, detectando animales seropositivos, eliminando los animales que presenten casos clínicos y controlando los vectores (Gollnick *et al.*, 2015).

La prevalencia de *C. burnetii* (16,8%) determinada en la Región Huetar Norte es similar a la reportada en bovinos de leche de Nuevo León, México (28,0%), en una zona con un microclima subtropical como Costa Rica y utilizando un ELISA indirecto (Salinas-Méndez *et al.* 2002). El número de sueros analizados, como la sensibilidad y especificidad de la técnica utilizada permitieron establecer la prevalencia de *C. burnetii* en la región Huetar Norte y descartar reacciones falsas positivas. Los distritos que presentaron mayor cantidad

de seropositivos fueron Zarcero (47,5%, 48/101) y Ciudad Quesada (25,7%, 26/101), mostrando sobre todo reacciones positivas medias (47,5%, 48/101). Como la infección se considera persistente en bovinos, y *C. burnetii* se considera un agente zoonótico, que se transmite a las personas mediante leche, productos de abortos, orina o heces de animales infectados, es importante dar seguimiento a estos hatos seropositivos e informar a las autoridades de salud, para que tomen las medidas correspondientes (Kersh *et al.*, 2013; OIE, 2021). Se recomienda implementar medidas de bioseguridad en estos hatos, para prevenir una diseminación del agente a otros hatos (Paul *et al.*, 2012) y tratar de aislar el agente. En el presente trabajo no se logró determinar la presencia del agente en la leche de vacas seropositivas, probablemente, por el reducido número de muestras analizadas (n=6), y porque el agente es excretado en forma intermitente en la leche de los bovinos (Kersh *et al.*, 2013). Se recomienda, realizar más investigaciones, para determinar la presencia del agente en hatos bovinos de Costa Rica y establecer si ocurren manifestaciones clínicas en los bovinos, como aborto, muerte fetal, partos de crías débiles o prematuros. o si cursa en forma asintomática (Saegerman *et al.*, 2015), además, si las personas que trabajan con estos animales han presentado fiebre, cefalea, mialgias, tos, fatiga, escalofríos, sudores nocturnos, náuseas o vómitos debido a la Fiebre Q (McQuiston *et al.*, 2002). Para controlar esta zoonosis es importante también controlar las garrapatas, que podrían transmitir el agente entre los animales, también es importante recordar que las bacterias son excretadas con las heces, orina o membranas fetales de animales infectados, y pueden permanecer viables durante meses y ser transportadas en forma de polvo por el viento a otros lugares, representando así una fuente de infección para personas y animales (Salinas-Méndez *et al.*, 2002).

La prevalencia determinada para *C. abortus* fue baja (1,3%), en concordancia con resultados obtenidos previamente en bovinos de Poás (0,5%) y ovinos (5,2%) (Villagra-Blanco *et al.*, 2015; Salazar *et al.*, 2015). Los distritos en los que se encontró la mayor cantidad de seropositivos fueron Ciudad Quesada (n=4) y Aguas Zarcas (n=3), mostrando reacciones fuertes positivas 87,5% (7/8), que según O'Neill *et al.* (2018) indican que los animales a lo mejor habían abortado recientemente. A pesar de que no se pudo determinar la presencia del agente en muestras vaginales, probablemente por la pequeña cantidad de muestras analizadas (n=4), por la excreción intermitente del agente o por la baja seroprevalencia determinada, es importante seguir realizando investigaciones para establecer

su presencia en el país y tomar en cuenta este agente como diagnóstico diferencial en abortos (Borel *et al.*, 2010). En un 6,5% (39/600) de los casos se establecieron coexposiciones *B. besnoiti* y *C. burnetii*, lo cual no ha sido reportado con anterioridad. Se recomienda divulgar a productores y veterinarios los resultados obtenidos en la presente investigación, alertar a las autoridades de salud sobre la presencia de agentes zoonóticos en fincas bovinas de la Región Huetar Norte y realizar más estudios para aislar los agentes detectados.

REFERENCIAS

- Álvarez-García, G., Frey, C. F., Mora, L. M. O., & Schares, G. (2013). A century of bovine besnoitiosis: an unknown disease re-emerging in Europe. *Trends in parasitology*, 29(8), 407-415.
- Alvarez-Garcia, G., Garcia-Lunar, P., Gutierrez-Exposito, D., Shkap, V., & Ortega-Mora, L. M. (2014). Dynamics of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle. *Parasitology*, 141(11), 1419-1435.
- Arias, M. L., Reyes, L., Chinchilla, M., & Linde, E. (1994). Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa) in meat producing animals in Costa Rica. *Revista de biología tropical*, 15-20.
- Awinda, P. O., Mealey, R. H., Williams, L. B., Conrad, P. A., Packham, A. E., Reif, K. E., ... & Ueti, M. W. (2013). Serum antibodies from a subset of horses positive for *Babesia caballi* by competitive ELISA demonstrate a protein recognition pattern not consistent with infection. *Clinical and Vaccine Immunology*, CVI-00479.
- Borel, N., Dumrese, C., Ziegler, U., Schifferli, A., Kaiser, C., & Pospischil, A. (2010). Mixed infections with *Chlamydia* and porcine epidemic diarrhea virus—a new in vitro model of chlamydial persistence. *BMC microbiology*, 10(1), 1-9.
- Bravo-Grau, S., & Cruz, J. P. (2015). Estudios de exactitud diagnóstica: Herramientas para su Interpretación. *Revista chilena de radiología*, 21(4), 158-164.
- Esteban-Gil, A., Grisez, C., Prevot, F., Florentin, S., Decaudin, A., Picard-Hagen, N., ... & Corboz, N. (2014). No detection of *Besnoitia besnoiti* DNA in the semen of chronically infected bulls. *Parasitology research*, 113(6), 2355-2362.

- Fallas-Elizondo, D., Calderón, J. C., Romero-Zuñiga, J. J., & Dolz, G. (2018). Presencia serológica de *Besnoitia besnoiti*, *Toxoplasma gondii*, *Coxiella burnetii* y *Chlamydia abortus* en hatos bovinos de Costa Rica. *Ciencias Veterinarias*, 36(3), 26-26.
- García-Lunar, P., Moré, G., Campero, L., Ortega-Mora, L. M., & Álvarez-García, G. (2015). Anti-*Neospora caninum* and anti-*Sarcocystis* spp. specific antibodies cross-react with *Besnoitia besnoiti* and influence the serological diagnosis of bovine besnoitiosis. *Veterinary Parasitology*, 214(1-2), 49-54.
- Gollnick, N. S., Scharr, J. C., Schares, G., & Langenmayer, M. C. (2015). Natural *Besnoitia besnoiti* infections in cattle: chronology of disease progression. *BMC veterinary research*, 11(1), 1-16.
- Gutiérrez, A. F., Yamamoto-Kimura, L., Velasco, L. Y., Espinoza, J. G., & García, M. C. M. (1994). Utilidad de las curvas de sensibilidad y especificidad conjunta en la aplicación de una prueba de diagnóstico. *Salud Pública de México*, 36(3), 311-317.
- Gutiérrez-Expósito, D., Esteban-Gil, A., Ortega-Mora, L. M., García-Lunar, P., Castillo, J. A., Marcén, J. M., & Alvarez-García, G. (2014). Prevalence of *Besnoitia besnoiti* infection in beef cattle from the Spanish Pyrenees. *The Veterinary Journal*, 200(3), 468-470.
- Jacquiet, P., Liénard, E., & Franc, M. (2010). Bovine besnoitiosis: epidemiological and clinical aspects. *Veterinary parasitology*, 174(1), 30-36.
- Kersh, G. J., Wolfe, T. M., Fitzpatrick, K. A., Candee, A. J., Oliver, L. D., Patterson, N. E., ... & Massung, R. F. (2010). Presence of *Coxiella burnetii* DNA in the environment of the United States, 2006 to 2008. *Applied and environmental microbiology*, 76(13), 4469-4475.
- Lenfant, F. (2013). Mise au point d'une technique de diagnostic sérologique par immunofluorescence indirecte de la Besnoitiose bovine à *Besnoitia besnoiti* (Doctoral dissertation).
- Mangili, P. M., Vesco, G., Feliziani, F., Paoloni, A., Menichelli, M., Cagiola, M., ... & Papa, P. (2009). Development and evaluation of the performance of an in-house ELISA to be used for the indirect diagnosis of Toxoplasmosis in sheep. *Proceeding of SIDILV*, Parma (Italy).

- McQuiston, J. H., Childs, J. E., & Thompson, H. A. (2002). Q fever. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 221(6), 796-799.
- Nasir, A., Lanyon, S. R., Schares, G., Anderson, M. L., & Reichel, M. P. (2012). Sero-prevalence of *Neospora caninum* and *Besnoitia besnoiti* in South Australian beef and dairy cattle. *Veterinary Parasitology*, 186(3-4), 480-485.
- O'Neill, L. M., O'Driscoll, Á., & Markey, B. (2018). Comparison of three commercial serological tests for the detection of *Chlamydia abortus* infection in ewes. *Irish veterinary journal*, 71(1), 1-9.
- OIE (2021). Fichas de información general sobre enfermedades animales- Fiebre Q. Recuperado de: <https://www.oie.int/doc/ged/D13999.PDF>
- Paul, S., Agger, J. F., Markussen, B., Christoffersen, A. B., & Agerholm, J. S. (2012). Factors associated with *Coxiella burnetii* antibody positivity in Danish dairy cows. *Preventive veterinary medicine*, 107(1-2), 57-64.
- Romero, J. J., Perez, E., Dolz, G., & Frankena, K. (2002). Factors associated with *Neospora caninum* serostatus in cattle of 20 specialised Costa Rican dairy herds. *Preventive veterinary medicine*, 53(4), 263-273.
- Romero, J. J., Van Breda, S., Vargas, B., Dolz, G., & Frankena, K. (2005). Effect of neosporosis on productive and reproductive performance of dairy cattle in Costa Rica. *Theriogenology*, 64(9), 1928-1939.
- Saegerman, C., Speybroeck, N., Dal Pozzo, F., & Czaplicki, G. (2015). Clinical indicators of exposure to *Coxiella burnetii* in dairy herds. *Transboundary and emerging diseases*, 62(1), 46-54.
- Salazar, L. F., Herrera, J. M., Zúñiga, J. J. R., & Dolz, G. (2015). *Chlamydia abortus* in Dairy Farms in Costa Rica. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 5(4), 179-185.
- Salinas-Meléndez, J. A., Avalos-Ramírez, R., Riojas-Valdez, V., Kawas-Garza, J., & Fimbres-Durazo, H. (2002). Estudio serológico de la fiebre 'Q' en animales de Nuevo León. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 44(2), 75-78.
- Stelzer, S., Basso, W., Silván, J. B., Ortega-Mora, L. M., Maksimov, P., Gethmann, J., ... & Schares, G. (2019). *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis in farm animals: Risk factors and economic impact. *Food and Waterborne Parasitology*, 15, e00037.

- Uzeda, R. S., Andrade, M. R., Corbellini, L. G., Antonello, A. M., Vogel, F. S., & Gondim, L. F. P. (2014). Frequency of antibodies against *Besnoitia besnoiti* in Brazilian cattle. *Veterinary parasitology*, 199(3), 242-246.
- Villagra-Blanco, R., Dolz, G., Montero-Caballero, D., & Romero-Zúñiga, J. J. (2015). Detection of antibodies against *Chlamydophila abortus* in Costa Rican sheep flocks. *Open veterinary journal*, 5(2), 122-126.

CONCLUSIONES GENERALES

- Los VPP determinados para las pruebas fueron para *T. gondii* 91,4%, *N. caninum* 64,7%, y *B. besnoiti* 100%.
- Las tres pruebas mostraron VPN altos (*T. gondii* 98,5%, *N. caninum* 100%, y *B. besnoiti* 99,0%).
- Se determinó la seroprevalencia global y a nivel de fincas para *T. gondii* (30,5% y 67,5%) en la zona Huetar Norte de Costa Rica.
- Se determinó una prevalencia global de *N. caninum* de 18,0% con una prevalencia a nivel de fincas de 75,0% en la zona Huetar Norte de Costa Rica.
- Se determinó coexposiciones de *B. besnoiti* y *T. gondii* en un 12,8% de los casos, *B. besnoiti* y *N. caninum* en un 11,9% y *T. gondii* y *N. caninum* en un 3,3% de los casos.
- Los resultados confirman la circulación de *T. gondii*, *N. caninum* y *B. besnoiti* en los hatos bovinos de la zona norte.
- Se determinó por primera vez la presencia de anticuerpos contra *B. besnoiti*, *C. burnetii* y *C. abortus* en bovinos de la región Huetar Norte de Costa Rica.
- Se determinó una seroprevalencia de 27,3% para *B. besnoiti*, 16,8% para *C. burnetii* y de 1,3% para *C. abortus* en los bovinos de la región Huetar Norte de Costa Rica.
- Se determinó seroprevalencias de 80,0%, 70,0% y 17,5% para *B. besnoiti*, *C. burnetii* y *C. abortus* a nivel de fincas, respectivamente.
- Se estableció la presencia de coexposiciones para *B. besnoiti* y *C. burnetii* en un 6,5% de las muestras analizadas.

RECOMENDACIONES GENERALES

- Informar a los productores y personal médico veterinario de la Región Huetar Norte sobre la presencia y circulación de los tres agentes apicomplexa en hatos bovinos.
- Implementar programas de educación y control de la toxoplasmosis en el hato bovino, para controlar esta enfermedad zoonótica y desatendida en Costa Rica
- Estudiar el impacto que tienen estos apicomplexa en el hato bovino de la región Huetar Norte (infecciones sencillas o concomitantes).
- Informar sobre los resultados y capacitar a los productores para que reconozcan las patologías y eviten la introducción de los agentes en sus hatos.
- Promover el control de vectores artópodos, como medio preventivo en la transmisión de las patologías abordadas que tienen este tipo de diseminación (*B. besnoiti* y *C. burnetii*).
- Alertar a las autoridades de SENASA sobre los hallazgos, para que tomen las previsiones del caso y eviten la diseminación de los agentes infecciosos hallados en este estudio, en particular de *C. burnetii* y *C. abortus* por su potencial zoonótico.
- Alertar a las autoridades de MINSA para que incluyan la coxelirosis y clamidiosis como diagnóstico diferencial en casos de insuficiencia cardíaca valvular, enfermedades respiratorias y abortos.
- Realizar estudios para confirmar la presencia de los tres agentes mediante técnicas de aislamiento o diagnóstico molecular.